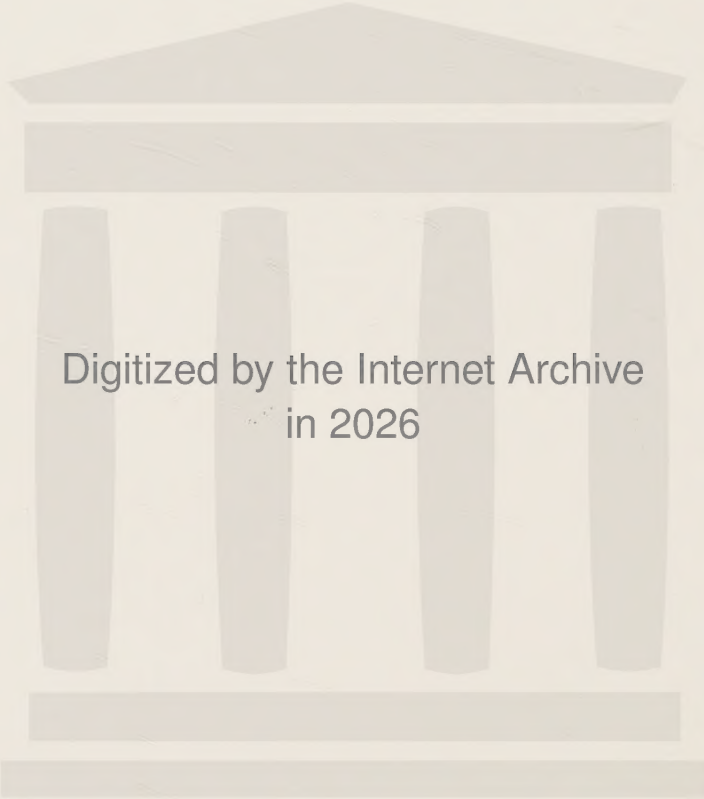


UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOGENESE
DER TUBULOINTERSTITIELLEN NEPHRITIS DER RATTE

Michael Delius

—

1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0027

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München
Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn

UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOGENESE
DER TUBULOINTERSTITIELLEN NEPHRITIS DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michael Delius
aus
München
1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. G. H. Thoenes
Mitberichterstatter	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

10. Feb. 1983



Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BN	Brown-Norway
C	Complement
CFA	Komplettes Freud'sches Adjuvans
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GBM	Glomeruläre Basalmembran
HBSS	Hank'sche Lösung
IC	Immunkomplexe
IF	Immunfluoreszenz
IFA	Inkomplettes Freund'sches Adjuvans
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RTBM	Tubuläre Basalmembran von Ratten
STBM	Tubuläre Basalmembran von Schafen
TBM	Tubuläre Basalmembran
TIN	Tubulointerstitielle Nephritis

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Material und Methoden	
2.1 Tiere	6
2.2 TBM-Präparation	6
2.3 Aufarbeitung homologer Rattennieren nach Sugisaki	8
2.4 Immunisierung	8
2.5 Blutabnahme, Entbluten	9
2.6 Nephrektomie, Biopsie	9
2.7 Transplantation	10
2.8 Nierenfunktion	11
2.9 Immunfluoreszenz	11
2.10 Histologie	12
2.11 Serumgewinnung (zum Serumtransfer)	12
2.12 Peritonealexsudat- und Lymphknotenzellen	12
3. Experimenteller Teil	
3.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung bei BN- und Lewis-Ratten	14
3.1.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der Immunisierung mit Schaf-TBM	
3.1.2 Einfluß der Mykobakteriendosis im CFA	24
3.1.3 TIN bei Lewis-Ratten	27
3.2 Reimmunisierungsexperimente	30
3.2.1 Reimmunisierung von BN-Ratten mit STBM, Ag- positiver Ratten-TBM oder Ag-negativer Ratten-TBM mit konstanter Dosis	30
3.2.2 Reimmunisierung von BN-Ratten mit STBM, Ag- negativer Ratten-TBM, CFA und Leber-Ag in steigender Dosierung	33
3.2.3 Reimmunisierung nach Transplantation	36
3.3 Nierentransplantation zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung	36
3.4 Transferversuch	46
4. Diskussion	48
5. Zusammenfassung	59
Literaturverzeichnis	

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Bis vor einem Jahrzehnt galt die Aufmerksamkeit bei der Erforschung von Nierenkrankheiten in erster Linie dem Glomerulus. Die Bedeutung, welche immunologische Vorgänge und Mechanismen bei der Entstehung der Glomerulonephritis spielen, wurde dabei immer mehr erkannt. Seit dem Ende der sechziger Jahre wird dem Interstitium und den Tubuli zunehmende Beachtung geschenkt. Die Hauptursachen für die interstitielle Nephritis beim Menschen sind bakterielle Infektion (Pyelonephritis) und Medikamente (medikamenteninduzierte tubulointerstitielle Nephritis). Bezüglich der Immunpathogenese dieser interstitiellen Erkrankungen bestehen widersprüchliche Ansichten bzw. nur kasuistische Beiträge.

Aus experimentellen Modellen der Nierenkrankheiten sind zwei Arten von Immunmechanismen bekannt, die im Zusammenhang mit der interstitiellen Nephritis diskutiert werden können: entzündliche Reaktionen (a) durch Immunkomplexe und (b) durch Membran-Antikörper. Der Pathomechanismus durch Immunkomplexe ist überwiegend glomerulär (HEYMANN-Nephritis) zu finden und weniger interstitiell. Das am besten bekannte Modell für den zweiten Pathomechanismus ist die nephrotoxische GN, bei der Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran an der GBM abgelagert werden. In der Folge kommt es zur Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen am Ort der Immunreaktion. Auch an Tubulusmembranen kann man experimentell eine Immunreaktion mit Membranantikörpern und interstitieller Entzündung erzeugen.

Wir haben uns dem gut definierten Krankheitsmodell der tubulointerstitiellen Nephritis (TIN) durch Basalmembran-Antikörper zugewandt, um die Pathogenese der interstitiellen Nierenerkrankung besser verstehen zu lernen.

Die TIN wurde als experimentelles Tiermodell zuerst von Steblay und Rudofsky 1971 am Meerschweinchen beschrieben (34): Meerschweinchen, die mit Kaninchen-TBM immunisiert wurden, entwickeln eine Nierenentzündung, die die Glomeruli unversehrt läßt, jedoch diffus über das Interstitium der Rinde ausgebreitet ist. Man sieht hauptsächlich mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Plasmazellen, Histiozyten) und Riesenzellen. Das Tubulusepithel ist verändert, stellenweise sind Tubulusepithelnekrosen, aber auch Regenerationserscheinungen sichtbar. Die TBM ist angegriffen und stellenweise ganz verschwunden. In der Immunfluoreszenz ist an der TBM von 80% bis 90% der Tubuli IgG linear abgelagert, die Tiere weisen hohe anti-TBM-Ak-Titer im Blut auf.

In weiteren Experimenten stellten sie fest, daß man durch Übertragung von Serum erkrankter Tiere, das einen hohen anti-TBM-Ak-Titer aufweist, diese Krankheit auf gesunde Meerschweinchen übertragen kann (35). Die Empfängertiere entwickeln genauso eine TIN, die die ganze Nierenrinde befällt, und die TBM ist in der IF durch Ak-Ablagerung positiv darstellbar. Außerdem werden C3 und Faktor B, der Proaktivator von C3 im alternativen Complementsystem, an der TBM abgelagert (28). Diese sind genauso wie mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark notwendig zur Ausbildung der TIN beim Meerschweinchen (25,26,27). Eine Übertragung der TIN durch sensibilisierte Lymphozyten erwies sich bei diesem Tiermodell als nicht möglich (27).

Nicht nur beim Meerschweinchen, sondern auch bei bestimmten Rattenstämmen ist es möglich, eine TIN zu induzieren. Beschrieben wurde dies zunächst von Sugisaki 1973 (36) und Lehmann 1974 (12). Während Sugisaki zur Immunisierung eine Suspension aus zerkleinerten Rattennieren von Sprague-Dawley Ratten verwandte, nahm Lehmann lyophilisiertes TBM-Ag von Rindernieren. Bei der Untersuchung verschiedener Rattenstämme stellte sich heraus, daß es bei Brown-Norway (BN)-Ratten gut möglich ist, eine TIN zu erzeugen, nicht jedoch bei Lewis-Ratten

(9,12), obwohl auch diese anti-TBM-Ak bilden. Ihnen fehlt an der TBM ihrer Niere das entsprechende Ag, an das die Ak bei den BN-Ratten binden (39). 1980 veröffentlichte Sugisaki eine Arbeit über die Induktion einer TIN bei Lewis-Ratten ohne die Mitbeteiligung von anti-TBM-Ak (37). Zur Immunisierung verwendete er eine Nierensuspension normaler Lewis-Ratten. Die Tiere entwickelten offenbar eine TIN mit Infiltration durch mononukleäre Zellen mit Zerstörung von Tubulusepithelzellen und Unterbrechung der Kontinuität der TBM. Die Übertragung von Lymphozyten erkrankter Tiere führte bei den Empfängern zu einer wenn auch nur schwach ausgeprägten TIN, was auf einen zellvermittelten Immunmechanismus hinweist. Damit war von neuem die Frage aufgeworfen, welche Rolle der anti-TBM-Ak bei der TIN der Ratte spielt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, der Bedeutung des anti-TBM-Ak bei der Pathogenese der TIN nachzugehen. Im einzelnen sollen folgende Fragen näher untersucht werden:

1. Wenn dem TBM-Antikörper eine entscheidende pathogene-tische Bedeutung zukommt, so sind die jüngsten Ergebnisse von Sugisaki unverständlich. Lassen sich die Ergebnisse von Sugisaki durch seine oder durch Anwendung anderer Methoden hier reproduzieren?
2. Die TIN ist ein akutes Ereignis, die anti-TBM-Ak sind über eine lange Zeit danach im Blut nachweisbar. Ist es möglich, eine chronische TIN ohne das vorhergehende akute Ereignis zu erzeugen?
3. Die akute Entzündung bei der TIN klingt über mehrere Wochen ab. Bis zu welchem Zeitpunkt nach der Immunisierung sind alle zur Auslösung einer TIN notwendigen Faktoren vorhanden? Diese Frage soll durch Transplantation gesunder Rattennieren in immunisierte Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden.

Die TIN der Ratte ist ein mit dem 7. Tag nach der Immunisierung beginnender akuter Prozeß, der sich zunächst nur durch

die fokale Ablagerung von anti-TBM-Ak äußert (9). Am 8. Tag wird er durch den Einstrom von Entzündungszellen sichtbar und ist bald danach auch makroskopisch festzustellen. Die volle Ausprägung der Entzündung ist nach 14 Tagen erreicht. In den folgenden Wochen kommt es zur narbigen Veränderung der Nierenrinde. Histologisch sieht man zu dieser Zeit eine lymphozytäre und plasmazelluläre Entzündung. Fortbestehende Ak-Ablagerungen an der TBM sind an der Mehrzahl der Tubuli nachweisbar. Eine progressive Zerstörung der Tubulusarchitektur ist nicht erkennbar. Eine experimentell gesicherte Erklärung für das akute Auftreten und darauffolgende Sistieren des Entzündungsprozesses gibt es nicht.

ad 1.

Der Grund dafür, daß eine TIN bei Lewis-Ratten - mit Ausnahme des Versuchs von Sugisaki - nicht zu erzeugen war, könnte in einer ungenügenden Stimulation bei der Immunisierung bestehen. Die Dosis von 4 mg Schaf-TBM in Verbindung mit 0,2 ml komplettem Freundschem Adjuvans führt bei fast allen BN-Ratten zu einer TIN, und daher erschien es bis jetzt nicht notwendig, sie zu verändern.

Für unsere Fragestellung bietet sich nun die Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der Immunisierung an. Die Abhängigkeit der TIN sowohl von der Menge der verwendeten TBM als auch von der Menge CFA, mit der jedes Tier immunisiert wird, wird untersucht. Die Dosen TBM und CFA, die sich bei BN-Ratten als am wirksamsten erweisen, werden dann kombiniert zur Immunisierung von Lewis-Ratten verwendet.

Die von Sugisaki erzeugte TIN bei Lewis-Ratten ist mit TBM-Ag vom gleichen Stamm induziert worden. Dieses TBM-Ag wird in einem weiteren Versuch auf seine Wirkung hin untersucht.

ad 2.

Die TIN wird durch einmalige Immunisierung erzeugt und ist bei der Ratte und beim Meerschweinchen eine bald darauf ein-

tretende akute Entzündung. Das Ziel einer zweiten Versuchsreihe ist es, ein Modell für eine chronische TIN zu finden, wie sie beim Menschen angetroffen wird. Das soll durch wiederholte Immunisierung mit einer Ag-Dosis erreicht werden, die bei einmaliger Gabe noch nicht zu einer TIN führt. Während bei einem Versuch eine konstante Ag-Dosis wiederholt über Wochen injiziert wird, wird in einem anderen die Ag-Dosis kontinuierlich von Woche zu Woche gesteigert.

ad 3.

Durch Transplantation einer normalen Niere eines genetisch identischen Tieres in ein von einer TIN befallenes Tier soll versucht werden festzustellen, ob und zu welchem Zeitpunkt nach Immunisierung der pathogenetische Præß fortwirkt. Nichtangehen der Entzündung im Transplantat zu einem bestimmten Zeitpunkt würde darauf hinweisen, daß zu einer TIN führende Faktoren dann nicht mehr in der nötigen Qualität oder Quantität vorhanden sind. Allerdings läßt sich die Unterscheidung, ob humorale oder zelluläre Prozesse beteiligt sind, so nicht treffen.

Und noch auf eine weitere Frage soll die Antwort gesucht werden: Die TIN beim Meerschweinchen ist Ak-vermittelt, da sie durch das Serum kranker Tiere auf gesunde übertragen werden kann. Auch Sugisaki beschrieb bei BN-Ratten durch Serumübertragung hervorgerufene Ak-Ablagerungen an der TBM und damit verbunden ein wenn auch nur sehr schwach ausgeprägtes zelluläres Infiltrat (36). Auf der anderen Seite ließ sich diese Beobachtung bei Serumübertragungsversuchen in diesem Labor nicht reproduzieren, obwohl diffuse IgG-Ablagerung entlang der TBM erkennbar war. Als mögliche Erklärung bietet sich an, daß die pro Tier verwendete Serummenge zu gering war. Zur Untersuchung dieser Frage wurde gesunden BN-Ratten eine größere Menge Serum erkrankter Tiere übertragen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiere

Bei den Versuchen werden Ratten der Inzuchtstämme BN und Lewis verwendet, die durch Histocompatibilitätsmerkmale genetisch definiert sind (Rt-1ⁿ und Rt-1^l). Beide Stämme werden durch Bruder-Schwester-Verpaarung seit vielen Generationen (ca. 10 Jahre) im Tierstall des Immunbiologischen Labors der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München gezüchtet. Die Zuchtkerne wurden 1972 von Günther am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg bezogen. Die genetische Reinheit der Stämme wird in regelmäßigen Abständen durch Hauttransplantation überprüft. Die Tiere werden unter einfachen hygienischen Maßnahmen getrennt von kommerziellen Versuchstieren gehalten.

Für die Versuche werden sowohl männliche als auch weibliche Tiere im Alter von 3 bis 12 Monaten verwendet.

2.2 TBM-Präparation

Die Methode zur Herstellung von TBM ist ein Standardverfahren im Labor und wurde von Krieger ausgearbeitet (9), wobei auf publizierte Präparationsverfahren (16,33) Bezug genommen wurde. Alle Arbeiten erfolgen mit gekühlten Lösungen bzw. auf Eis.

Die TBM werden auf Schaf- und Rattennieren gewonnen, wobei prinzipiell nach dem gleichen Verfahren vorgegangen wird. Die Schaf- oder Rattennieren werden längs geteilt, mit einer gebogenen Schere wird die Rinde entlang der Markkrindengrenze abgeschnitten. Das Mark wird verworfen, die Rindenstücke werden kleingeschnitten und in PBS von pH 7.2 aufgenommen. Portionen von ca. 40g werden auf einem Sieb der Maschengröße 125 μ m (Fa. Bachhofer, Reutlingen) mit einem kleinen Erlenmeyerkolben zu einem Brei zerdrückt. Dieser wird mehrmals auf

den Sieb als einer feineren Siebgröße zerkleinert und wieder locker verrieben. Zwischendurch wird mit PBS nachgewaschen. Bei der gewählten Siebgröße passiert ein großer Teil der Glomeruli das Sieb, die Tubuli und das Bindegewebe hingegen bleiben auf dem Sieb hängen, von wo sie mit PBS in ein Becherglas abuntergespült werden. Nach dem Sedimentieren wird der Überstand abgeseigt und das Sediment in einen Potter-Blender-Homogenisator (Fa. Braun, Melsungen) weiter zerkleinert. Der so gewonnene Brei wird mehrmals bei 400g für 10 min. in PBS gewaschen, mit der Überstand aber ist. Das gewonnene Sediment wird dann beschallt (Ultraschallgerät Fa. Branson Typ 8 12 mit Mikropipette, auf Stufe 6 betrieben), bis bei mikroskopischer Kontrolle nahezu nur noch Basalmembranmaterial und möglichst wenig feste Zellverbände zu sehen sind. Die 6 bis 8 min. dauernde Beschallung erfolgt wegen der auftretenden Erwärmung in 2 min. Schritten unter guter Kühlung. Danach wird der Brei aus 0,14 M NaCl-Lösung durch Zugabe von 1 M NaCl-Lösung in eine 1 M Lösung überführt. Diese wird mehrmals bei 1000 g für 10 min. in 1 M NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird das Salz durch mehrmalige Zentrifugation mit Aq.dest. entfernt. Die Basalmembranen werden gefriergetrocknet und bei -30°C aufbewahrt.

Aus 100 g Nierenbrei lassen sich etwa 1000 mg (Trockengewicht) TBM gewinnen. Der Grad der Verunreinigung ist relativ hoch, da das Bindegewebe der Gefäße durch das Sieb nicht entfernt wird. Außerdem lassen sich bei mikroskopischer Kontrolle immer auch eine große Anzahl Glomeruli nachweisen.

Die Versuche zu dieser Arbeit wurden mit drei verschiedenen TBM-Präparationen durchgeführt, bei den Versuchen mit Ratten-TBM wurde mit jeweils einer Präparation gearbeitet.

2.3 Aufarbeitung homologer Rattennieren nach Sugisaki (37)

Nieren von Lewis-Ratten werden mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten. Eine 50%ige Suspension in 0.9% NaCl wird im Potter-Elvehjem-Apparat homogenisiert und 3 min. lang beschallt. Die frisch hergestellte Suspension wird sofort verwendet.

2.4 Immunisierung

Die lyophilisierte TBM wird in den notwendigen Mengen in 0.9% NaCl-Lösung suspendiert. Dazu wird sie in zwei über einen 3-Wegehahn mit Luer-lock fest miteinander verbundenen Spritzen (fa. Pharmaseal Labs.) hin- und hergepreßt. Nach Zugabe der entsprechenden Menge von komplettem und inkomplettem Freundschem Adjuvans (Fa. Difco-Bacto) wird durch weiteres intensives Mischen eine cremeartige Emulsion erzeugt. Dieses ist erreicht, wenn ein Tropfen der Emulsion auf der Wasseroberfläche nicht mehr zerfließt. Die vollständige Emulgierung ist Voraussetzung für gleichartige Versuchsansätze. Kühlung im Eisbad erleichtert die Emulgierung.

Die Injektion erfolgt, sofern im Versuchsaufbau nicht anders erwähnt, unter Narkose subkutan in die Hinterpfoten der Ratten. Ein langer Stichkanal von den Zehen bis zur Ferse verhindert den Wiederaustritt der Emulsion. Bei den meisten Versuchen werden je 0.2 ml links und rechts gespritzt. In einigen Versuchen wird als zweites Adjuvans Pertussisvaccine verwendet, von der je 0.25 ml subkutan in beide Oberschenkel injiziert werden. Das Pertussisadjuvans wurde freundlicherweise von den Behringwerken, Marburg, zur Verfügung gestellt. Es enthält 3×10^8 Keime/ml.

2.5 Blutabnahme, Entbluten

Die Blutabnahme erfolgt in Äthyläthernarkose. Die Tiere werden auf dem Rücken fixiert. Nach einem schrägen Hautschnitt in der Leiste werden die großen Beingefäße freipräpariert und mit einer 1 ml-Tuberkulinspritze und 18-er Kanüle die Beinvene punktiert. Die Wunde wird mit einer Hautnaht verschlossen. Das Entbluten erfolgt über die Aorta von der Bifurcatio Iliaca her. Je nach Größe des Tieres lassen sich bis zu 10 ml Blut gewinnen.

2.6 Nephrektomie, Biopsie

Das Abdomen der Ratte wird rasiert und mittels Medianschnitt eröffnet. Die über der Niere liegenden Därme werden durch eine feuchte Kompresse zur Seite gehalten. Eine gebogene Kocherklemme wird unter dem Nierenhilus mit Gefäßen und Ureter hindurchgeschoben, dann der Hilus mit einem festen Faden abgebunden. Die Niere wird mit Pincetten vorsichtig aus ihrer Kapsel herausgeschält und abgeschnitten. Das Abdomen wird mit Einzelnähten verschlossen.

Aus dem Nierenpräparat wird zentral ein Längsstreifen herausgeschnitten. Der größere Teil davon wird für die Histologie verwendet und sofort in Formalin fixiert. Ein kleineres Stück wird in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan auf einem Korkplättchen festgefroren. Die Aufbewahrung erfolgt in Plastikfolie eingeschweißt und evakuiert bei -70°C .

Für eine Biopsie wird anstelle der Niere nur ein keilförmiges Stück Nierengewebe entfernt. Nach dem Freilegen der Niere wird die Kapsel vorsichtig mit einem Skalpell geöffnet und mit einem Wattestäbchen auseinandergeschoben. Durch einen halbtiefen Schnitt mit dem Skalpell und einer Rundschere wird ein keilförmiges Stück Niere entnommen. Dieser Schritt muß wegen der heftigen Blutungen sehr schnell erfolgen. Die Blutung wird durch Komprimieren der Niere mit Wattestäbchen zum Stehen gebracht und die Nierenkapsel durch mikrochirurgische Fäden

der Stärke 9 vernäht.

2.7 Transplantation

Die mikrochirurgischen Transplantationen wurden vom Referenten dieser Arbeit ausgeführt. Die Technik gründet sich auf die Erstbeschreibung von Lee (10) und wird hier nur im Prinzip mitgeteilt.

Spenderniere (rechts):

Der Ureter der Niere wird freipräpariert und in seinem unteren Teil mit einem Faden angeschlungen und durchtrennt. Die Nierenarterie und -vene sowie die großen Bauchgefäße werden freipräpariert. Seitliche Gefäße werden unterbunden und durchtrennt. Aorta und Vena Cava werden an den unteren Enden unterbunden. Die Niere wird mit kalter NaCl-Lösung vom Aortenstumpf her perfundiert. Die NaCl-Lösung kann über die Vena Cava abfließen. Die großen Bauchgefäße werden proximal der Unterbindungen so durchtrennt, daß ihr unteres Ende jeweils verschlossen ist und das obere offene zur Anastomose zur Verfügung steht. Die Niere wird in gekühlter PBS aufbewahrt.

Empfänger:

Der rechte Ureter wird freipräpariert, angeschlungen und oberhalb davon durchtrennt. Nach der Nephrektomie werden die großen Bauchgefäße direkt unterhalb der Nierengefäßabgänge freipräpariert. Mit einer gebogenen Spezialklemme werden sie am oberen und unteren Ende abgeklemmt. Die Blutzufuhr zur linken Niere bleibt dabei ebenso unberührt wie die Durchblutung des Intestinum. Die Anastomose des offenen Endes der Aorta des Transplantats erfolgt durch zwei fortlaufende Nähte an der in Längsrichtung aufgeschnittenen Aorta des Empfängers. Die Vena Cava des Transplantats wird in ähnlicher Weise mit der des Empfängers verbunden. Während der Transplantation wird die Niere mit PBS gekühlt. Eine gute Durchblutung nach dem

Lösen der Gefäßklemme ist an einer hellroten Farbe des Organs erkennbar. Die beiden Ureterenden werden unter dem Stereomikroskop verbunden. Zur Offenhaltung des Lumens wird ein dünner, über der Flamme ausgezogener Plastikkatheter verwendet. Er muß durch eine Naht am Verrutschen innerhalb des Lumens gehindert werden. Die Ureterenden werden durch sechs Knopfnähte miteinander verbunden. Die Niere wird durch eine Ligatur am ursprünglichen Gefäßstumpf fixiert.

2.8 Nierenfunktion

Kreatinin

Die Kreatininbestimmung erfolgt mittels Ingotest (Fa. Boehringer, Ingelheim). Für die Mikromethode sind 200 μ l Serum erforderlich. Das Verfahren arbeitet mit vorheriger Enteiweißung. Gemessen wird mit einem Zeiss-Photometer bei 546 nm. Eine Normalwertbestimmung bei 20 Ratten ergab einen Wert von 0.93 mg/100 ml bei $s = 0.13$.

Harnstoff

Die Harnstoffbestimmung erfolgt ebenfalls mittels Ingotest. Eine Normalwertbestimmung bei BN-Ratten (31 Tiere mit einem großen Anteil ungefähr 1 Jahr alter Tiere) ergab einen Mittelwert von 43.4 mg Harnstoff/100 ml bei $s = 5.43$.

2.9 Immunfluoreszenz

Gefrierschnitte von 4 μ m Dicke werden auf einem Objektträger getrocknet und danach 30 min. in PBS gewässert. Für den Nachweis von in vivo gebundenem Ak und Complement wird in einer feuchten Kammer mit Fluorescein-Isothiocyanat-anti-Ratten-IgG oder FITC-anti-Ratten-C3 (Fa. Cappel Labs.) für 30 min. inkubiert und danach ca. 1 Stunde in PBS gewässert. Nach dem Eindecken mit Glycerin-PBS (1:9) wird die IF mit einem Auf-

lichtmikroskop (Fa. Zeiss) beobachtet. Die Fotografien werden mit einem 23-DIN-Film (Ektachrom^R) und automatischer Belichtungseinstellung gemacht.

Zum Nachweis von Serumantikörpern (indirekte IF) werden Gefrierschnitte normaler BN-Rattennieren verwendet. Man inkubiert mit dem Serum für 30 min., wässert in PBS und inkubiert dann mit FITC-anti-Ratten-IgG.

Ak-Titration:

Die Testserien werden in 1:3 Verdünnungsreihe wie bei der indirekten IF aufgetragen. Der Endtiter ist die letzte Verdünnungsstufe, welche noch deutlich fluoreszierende TBM zeigt.

2.10 Histologie

Die Histologie wurde teilweise vom Immunbiologischen Labor ausgeführt. Bei den Experimenten zur Reimmunisierung und Transplantation erfolgte die Bearbeitung und Beurteilung der Schnitte durch Herrn Prof. Langer, Patholog. Institut Mainz. Alle Schnitte sind mit der PAS-Reaktion gefärbt.

2.11 Serumgewinnung (zum Serumtransfer-Versuch)

Die Ratten werden mit 0.4 mg STBM in 0.2 ml CFA mit 0.5 ml PTA pro Tier immunisiert. Nach 25 Tagen werden alle Tiere mit der gleichen STBM-Dosis mit CFA, jedoch ohne PTA, reimmunisiert. Der Ak-Titer beträgt zu dieser Zeit ebenso wie 14 Tage später 1:81. Am 17. Tag nach der Reimmunisierung werden alle Ratten entblutet, das Serum wird durch Zentrifugation gewonnen.

2.12 Peritonealexsudat- und Lymphknotenzellen

Die Gewinnung des Peritonealexsudats erfolgt in Anlehnung an die bei Williams und Novotny beschriebenen Methoden (8,21,43).

5 ml dünnflüssiges Paraffinöl werden durch einen Bakteri. filter gesaugt und in den Bauchraum der Ratte injiziert. 3 oder 4 Tage später wird der Bauchraum eröffnet und zweimal mit je 10 ml HBSS (Grand Island Biochemicals) gespült. Außerdem werden nach dem Entbluten die paraaortalen Lymphknoten entfernt. Mit zwei spitzen Pincetten werden sie in HBSS zerpflückt. Das Bindegewebe wird durch Filtration durch Gaze abgetrennt. Die Zellen werden dreimal mit 80 g zentrifugiert und gewaschen. Die Leukozyten werden in der Neubauer-Kammer gezählt, wo auch der Prozentsatz der lebenden Zellen ermittelt wird. Er wird durch die Aufnahme von Trypanblau bestimmt und beträgt immer mehr als 85%. Ein Versuch erbringt bei einem immunisierten Tier mindestens 10^7 Peritonealexsudatzellen.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung bei BN- und Lewis-Ratten

3.1.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der Immunisierung mit Schaf-TBM (STBM)

3.1.2 Einfluß der Myobakteriendosis im CFA

3.1.3 TIN bei Lewis-Ratten

Zu 3.1.1

Versuchsaufbau

Gruppen von BN- und Lewis-Ratten werden mit verschiedenen Dosen STBM in 0.2 ml CFA mit 0.5 ml PTA immunisiert. Das Dosisspektrum reicht von 0.004 mg bis 40 mg (Tab.1). Die Kontrollgruppe bekommt nur CFA und PTA, jedoch keine STBM gespritzt. Nach 14 Tagen wird den Tieren zur Bestimmung der Retentionswerte und des anti-TBM-Ak-Titers Blut abgenommen und die linke Niere entfernt, um sie immunhistologisch und histologisch zu untersuchen. Nach 50 Tagen wird zur Bestimmung der anti-TBM-Ak-Titer erneut Blut abgenommen.

Ergebnisse

Makroskopisch ist zu erkennen, daß bei BN-Ratten verschiedene STBM-Dosen zu unterschiedlich ausgeprägter TIN führen. Bei den Tiergruppen, die mit 40 mg, 4 mg oder 0.04 mg immunisiert sind, bleibt die Nephritis an der Nierenoberfläche auf bestimmte Areale beschränkt, die sich von ihrer Umgebung als erhabene, gelblich-graue Flecken abzeichnen. In der Regel ist weniger als die Hälfte der Nierenoberfläche von ihnen bedeckt, sie konfluieren nur selten. Auf der Schnittfläche sind sie als keilförmige, helle Areale zu sehen, die das Nierenmark nicht erreichen. Bei den dazwischenliegenden Dosen von

TABELLE 1
BN-Ratten

<u>Dosis (mg)</u>	<u>Makroskopie</u>	<u>Histologie</u>	<u>EF</u>
40	große, erhabene gelbe Flecken	subkortikales Infiltrat wenig Riesenzellen 50% der Rinde infiltriert	diffus +
4	erhabene, gelbe Flecken	diffuses Infiltrat Riesenzellen Ödem	diffus +
0.4	blasse, geschwollene, gelbliche Nieren	diffuses, auf die ganze Rinde ausgedehntes Infiltrat viele Riesenzellen sehr starkes Ödem ausgedehnte Tubuluszerstörung	diffus +
0.1	konfluierende, erhabene, gelbe Flecken	diffuses Infiltrat viele Riesenzellen Ödem	diffus +
0.04	erhabene, gelbe Flecken	diffuses Infiltrat Riesenzellen kein Ödem	diffus +
0.004	normal	normal	negativ
0	normal	normal	negativ

0.1 mg und 0.4 mg sind die Veränderungen stärker ausgeprägt. Bei den mit 0.1 mg immunisierten Tieren nehmen die erhobenen Flecke einen größeren Teil der Nierenoberfläche ein und konfluieren stärker. Bei den mit 0.4 mg immunisierten Tieren ist die ganze Nierenoberfläche verändert, diese Nieren sind deutlich vergrößert und blaßgrau. Auf der Schnittfläche ist zu erkennen, daß die gesamte Rinde von der Veränderung betroffen ist. Die mit 0.004 mg immunisierten Tiere und die Kontrolltiere weisen keine Veränderungen an ihren Nieren auf. Alle Nieren der Lewis-Ratten sehen normal aus.

Histologisch bestätigt sich der bereits makroskopisch beobachtete Unterschied. Bei den mit 0.004 mg immunisierten BN-Ratten und den Kontrolltieren ist kein pathologischer Befund zu erheben. Alle anderen Nieren zeigen in der Histologie entzündliche Veränderungen unterschiedlichen Ausmaßes. Die Nieren der mit 0.04 mg immunisierten Ratten sind nur stellenweise infiltriert. Das Infiltrat besteht aus mononukleären Zellen und ist nur subkapsulär lokalisiert. Riesenzellen sind selten vorhanden, TBM-Deformierungen mit ausgedehnter Tubuluszellzerstörung sind nicht zu sehen. Auch ein interstitielles Ödem liegt nicht vor. Bei den mit 40 mg immunisierten Tieren ist der überwiegende Teil der Rinde subkapsulär infiltriert, ansonsten entspricht das Bild dem oben beschriebenen. Granulozyten sind selten und nur in direkter Nachbarschaft der Tubuli zu erkennen. Die Tubulusarchitektur bleibt also im wesentlichen erhalten mit dazwischenliegenden Infiltratstraßen (Abb.1). Bei den mit 4 mg immunisierten Tieren ist die Entzündung ausgedehnter mit mehr Granulozyten, mononukleären Zellen und Riesenzellen, die diffus die Rinde infiltrieren. Auch das interstitielle Ödem ist ausgeprägter (Abb.2). Bei den mit 0.1 mg immunisierten Tieren ist das Bild ähnlich. Die stärkste TIN ist bei den mit 0.4 mg immunisierten Tieren zu sehen. Die Nierenrinde ist in ihrer ganzen Ausdehnung infiltriert und stark ödematös. Viele Riesenzellen sind vorhanden, die oft

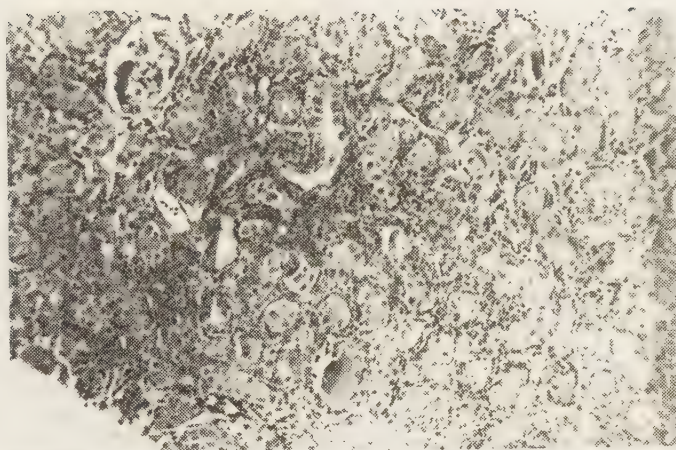


Abb.1: Infiltrat bei einer mit 40 mg STBM immunisier-
ten Ratte

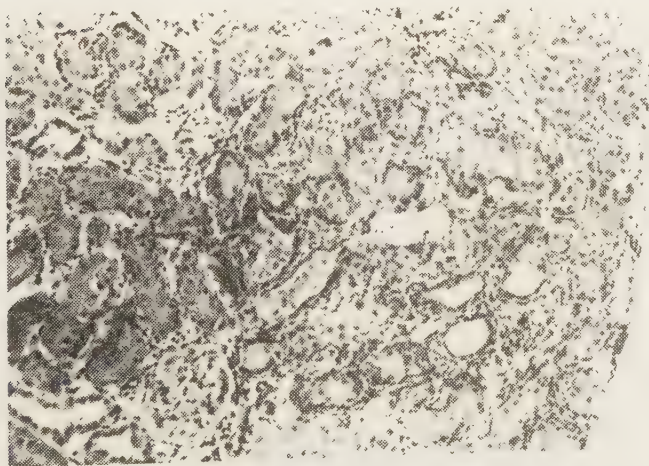


Abb.2: Infiltrat bei einer mit 4 mg STBM immunisier-
ten Ratte

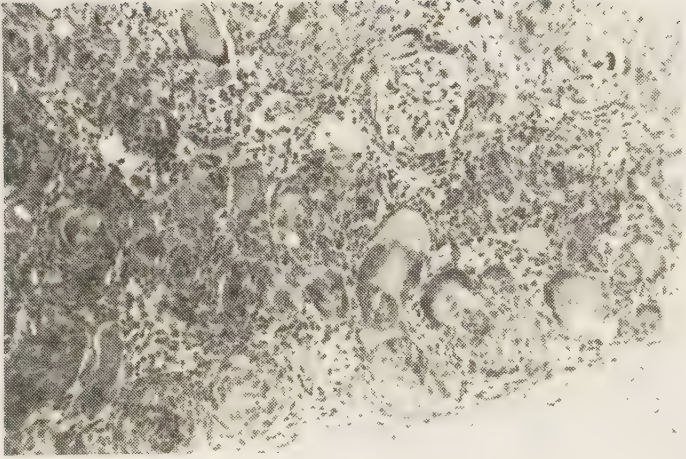


Abb.3: Infiltrat bei einer mit 0.4 mg STBM immunisierten Ratte. Auffallend sind viele Riesenzellen.

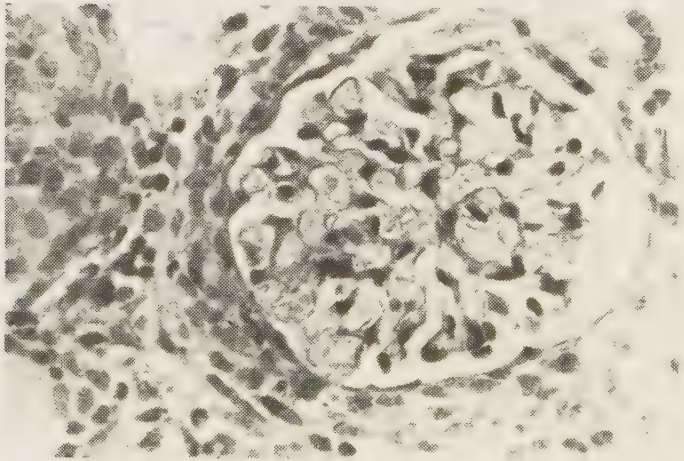


Abb.4: Normaler Glomerulus

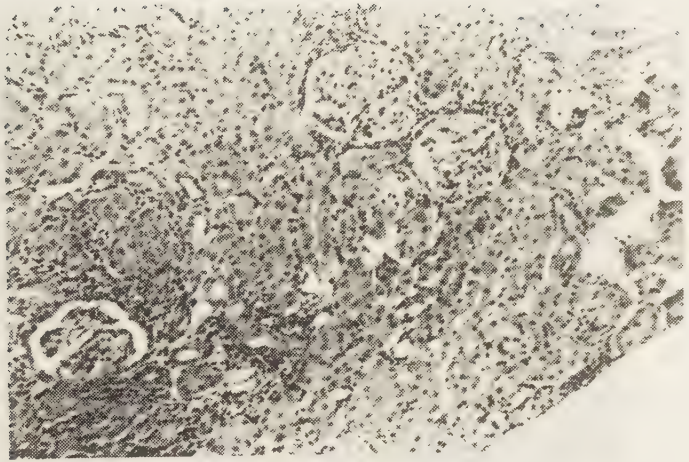


Abb.5: Fokales Infiltrat der Lewis-Ratte, deren Niere befallen ist.



Abb.6: IF mit anti-IgG: diffuse Ak-Ablagerung

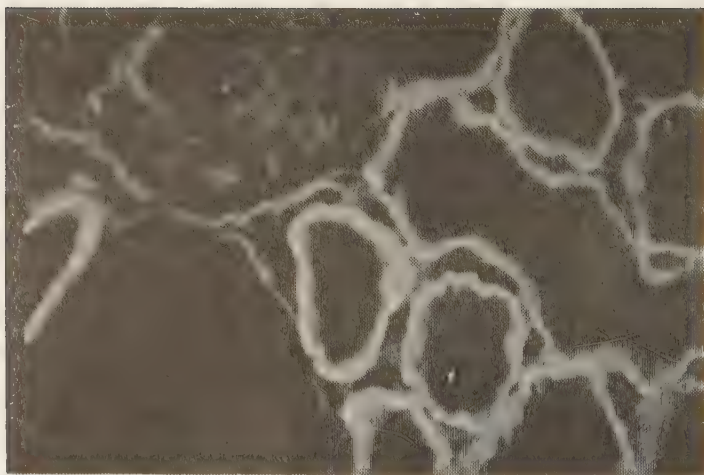


Abb. 7: IF mit anti-IgG bei stärkerer Vergrößerung

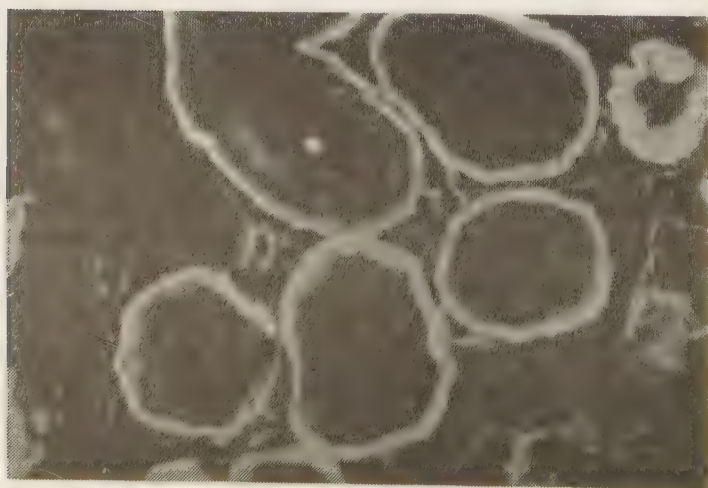


Abb. 8: IF mit anti-C1: Die ganze TBM der Tubuli ist anfärbar.

peritubulär liegen, und auch Granulozyten, die teilweise in das Tubuluslumen vorgedrungen sind. Viele Tubuli sind zerstört und in Auflösung begriffen mit oft sehr stark geschlängelter TBM (Abb.3). Die Glomeruli sind histologisch normal (Abb.4). Bei allen Lewis-Ratten sind keine Infiltrate nachweisbar. Eine Ausnahme bildet eine Niere, bei der ein Granulom mit einer Riesenzelle und Granulozyten auftritt (Abb.5). Da dies, abgesehen von einigen unspezifischen perivaskulären und periglomerulären Infiltraten, die auch bei den Kontrolltieren auftreten, die einzige bei den Lewis-Ratten zu beobachtende Veränderung ist, ist die Deutung als TIN nicht gerechtfertigt.

In der Immunhistologie mit anti-Ratten-IgG weisen die BN-Kontrolltiere und die mit 0.004 mg immunisierten Tiere keine IgG-Ablagerungen auf. Bei allen mit einer höheren Dosis STBM immunisierten Tieren sind jedoch IgG-Ablagerungen an der TBM zu sehen. Die Mehrheit der kortikalen Tubuli weist solche Ablagerungen auf, ausgenommen sind besonders periglomerulär liegende Tubuli. Eine Beziehung dieser diffusen Membranfluoreszenz (Abb.6,7) zum histologisch sichtbaren fokalen Infiltrat besteht also nicht. Bei den Lewis-Nieren ist keine IgG-Ablagerung nachweisbar. Die IF mit den anti-Ratten-C3 erweist sich als schwerer beurteilbar. Auch bei den Kontrolltieren kommt es zur Fluoreszenz der TBM, die jedoch immer nur einzelne Segmente und nicht die ganze Zirkumferenz des Tubulus betrifft. Nur wenn die TBM an mehreren Tubuli deutlich ringförmig fluoresziert, wird der Befund als positiv angesehen. Eine solche IF mit anti-Ratten-C3 ist nur eindeutig bei den mit 0.1 mg oder 0.4 mg STBM immunisierten BN-Ratten zu erhalten. Die Zahl der so fluoreszierenden Tubuli ist geringer als die der mit anti-Ratten-IgG fluoreszierenden, und die Tubuli liegen meist in Gruppen zusammen. Bei den Nieren, bei denen ein starkes interstitielles Ödem auch in der IF vermutet werden

kann, findet sich auch Complement (Abb.8).

Bei den Lewis-Ratten sind keine C3-Ablagerungen nachweisbar.

Der Titer der Basalmembranantikörper gegen TBM zur Zeit der Nephrektomie ist in Tab.2 aufgeführt. Die Werte wurden an Poolseren der einzelnen Gruppen bestimmt und liegen zwischen 1:81 und 1:729. Der Titerunterschied ober- und unterhalb 0.4 mg bzw. 0.1 mg STBM ist eventuell auch darauf zurückzuführen, daß die Titer in verschiedenen Serien bestimmt wurden. Es gibt keinen Titerunterschied von drei Stufen, das Maß eindeutiger Differenz. Eine schwere TIN ist nicht mit einem höheren Ak-Titer verbunden. 50 Tage nach der Immunisierung ist der Ak-Titer bei den Ratten, bei denen er erneut bestimmt wurde, nicht abgefallen.

Bei den drei Gruppen von Lewis-Ratten, deren anti-TBM-Ak-Titer bestimmt wurde, unterscheidet er sich nicht von dem der BN-Ratten. Auch hier liegt er bei 1:243 oder 1:729. Der 50 Tage nach der Immunisierung bei den gleichen Tieren gemessene Titer liegt allerdings mit 1:27 deutlich niedriger.

Die Nierenfunktion ist entsprechend der Ausprägung der TIN bei den BN-Ratten am deutlichsten eingeschränkt, die mit 0.4 mg STBM immunisiert wurden. Ihr Serumkreatinin liegt zum Zeitpunkt der Nephrektomie im Schnitt bei 3.5 mg/100 ml, der Harnstoff bei 200 mg/100 ml (Tab.2). Die 4 Tiere mit Harnstoffwerten über 300 mg/100 ml starben kurze Zeit darauf, alle anderen Tiere überlebten. Erhöhte Harnstoff- und Kreatininwerte finden sich auch bei den mit 4 mg, 0.1 mg oder 0.04 mg STBM immunisierten Tieren. Keine Lewis-Ratte hatte erhöhte Retentionswerte.

TABELLE 2

<u>Zahl d. Tiere</u>	<u>Dosis (mg)</u>	<u>anti-TBM-Ak bei d.Nephrektomie</u>	<u>anti-TBM-Ak 50 Tage post Imm.</u>	<u>Harnstoff (mg/100ml)</u>	<u>Kreatinin (mg/100ml)</u>
BN-Ratten					
3	40	1:243	1:243	48.4 (s=6.8)	1.00 (s=0.1)
4	4	1:729	1:243	110.8 (s=18.9)	1.78 (s=0.27)
8	0.4	1:243	1:243	263.5 (s=61.4)	3,55 (s=0.56)
4	0.1	1:81	∅	74,8 (s=14.2)	1.02 (s=0.15)
4	0.04	1:81	∅	63.7 (s=33.2)	1.05 (s=0.10)
4	0.004	negativ	∅	45.7 (s= 1.8)	1.08 (s=0.24)
4	0	negativ	∅	51.7 (s=12.1)	1.04 (s=0.11)
Lewis-Ratten					
3	40	1:729	1:27		
4	4	1:243	1:27		
8	0.4	1:729	1:27		
4	0.04	∅	∅		
4	0.004	∅	∅		
4	0	∅	∅		

Zusammenfassung

Alle BN-Ratten entwickeln bei der Immunisierung mit STBM im Dosisbereich von 0.04 bis 40 mg eine TIN. Die TIN ist bei der Dosis von 0.4 mg STBM maximal ausgeprägt, nicht bei der höchsten Dosis. Unabhängig von der Stärke der TIN ist bei allen befallenen Tieren IgG an der TBM im gesamten Cortex abgelagert. Der anti-TBM-Ak-Titer korreliert ebenfalls nicht mit der Stärke der TIN. Er ist auch 50 Tage nach der Immunisierung nicht abgefallen. Im Gegensatz zu BN-Ratten bekommen Lewis-Ratten bei Immunisierung mit STBM im gesamten Dosisbereich keine TIN. Der anti-TBM-Ak-Titer ist wie bei den BN-Ratten erhöht, nach 50 Tagen aber abgefallen.

Zu 3.1.2 Einfluß der Myobakteriendosis im CFA

Versuchsaufbau

Das komplette Freundschs Adjuvans enthält (nach Angaben des Herstellers) 5 mg Myobakterien in 10 ml, das entspricht einer injizierten Dosis von 0.1 mg pro Tier. Auf der Grundlage dieser Information wird trockenes Myobakterium tuberculosis (Fa. Difco Labs.) mit inkomplettem Freundschem Adjuvans so vermischt, daß der Dosisbereich von 10 mg bis 0.01 mg Myobakterien reicht (Tab.3). Es werden 6 Gruppen mit jeweils 3 BN-Ratten gebildet. Bis auf die Kontrollgruppe erhalten alle Tiere 4 mg STBM. 4 Gruppen bekommen dazu CFA mit der aus Tab. 3 ersichtlichen Myobakteriendosis. Eine Gruppe erhält statt CFA IFA, eine Kontrollgruppe CFA mit der höchsten Myobakteriendosis ohne STBM. Bei diesem Versuch wird kein PTA verwendet. 14 Tage nach der Immunisierung wird den Tieren eine Niere sowie Blut zur Bestimmung des anti-TBM-Ak-Titers und der Nierenfunktion entnommen.

Ergebnisse

Wie aus Tab.3 ersichtlich, führen höhere Myobakteriendosen auch zu einer stärker ausgeprägten TIN. 10 mg M.tuberculosis führen makroskopisch zu großen, blassen, geschwollenen Nieren, deren Rinde auf der Schnittfläche verbreitert erscheint.

1 mg M.tuberculosis ruft eine den überwiegenden Teil der Nierenoberfläche mit blaßgrau-gelblichen Flecken bedeckende TIN hervor. 0.1 mg M.Tuberculosis erzeugt das gleiche, nur weniger ausgeprägte Bild. Die mit 0.01 mg M.tuberculosis immunisierten Tiere hatten wie die Kontrolltiere normale Nieren. IFA mit STBM führt zu einer TIN mit wenigen graugelben Flecken auf der Niere.

Makroskopischer und histologischer Befund sind kongruent. Bei den mit 10 mg M.tuberculosis immunisierten Ratten ist die Rinde in ihrer ganzen Tiefe infiltriert mit ausgeprägtem interstitiellem Ödem, vielen Riesenzellen und starker Tubuluszerstörung. 1 mg M.tub. führt zu einer weniger ausgeprägten Entzündung, ebenfalls mit vielen Riesenzellen, 0.1 mg M.tub. zu einem noch geringeren Infiltrat mit wenigen Riesenzellen. Bei den mit IFA immunisierten Tieren findet man das Infiltrat nur fokal subkapsulär mit vereinzelt Riesenzellen. Hier hätte man vom makroskopischen Befund her eine etwas stärkere Entzündungsreaktion erwartet. Bei den mit 0.01 mg M.tub. immunisierten Tieren und den Kontrolltieren ist auch histologisch keine Anomalie zu sehen.

Die direkte IF zeigt diffuse IgG-Ablagerungen bei allen Tieren mit Ausnahme der Kontrolltiere. C3 ist bei den mit 10 mg, 1 mg und 0.1 mg immunisierten Tieren abgelagert.

Der Titer der anti-TBM-Ak liegt bei den mit 10 mg, 1 mg oder 0.1 mg immunisierten Ratten bei 1:81, bei den mit 0.01 mg

TABELLE 3

Dosis (mg)	Makroskopie	Histologie	IF	RN	Ratten
N.tub.					
10	große, geschwollene, blasse Nieren	ganze Rinde infiltriert sehr viele Riesenzellen sehr starkes Ödem	diffus +		
.	ganz von konfluierenden Flecken bedeckt	ganze Rinde infiltriert sehr viele Riesenzellen Ödem	diffus +		
100	große, konfluierende Flecken	Rinde nicht diffus infiltriert wenige Riesenzellen	diffus +		
1000	normal	normal	diffus +		
10000	keine erkennbare, kleine Flecken	keine erkennbare Infiltrate	diffus +		
100000	normal	normal	negativ		

bzw. IFA immunisierten bei 1:243. Wieder ist kein klarer Titerunterschied feststellbar, es besteht keine Korrelation zur Ausprägung der TIN (Tab.4).

Die Nierenfunktion ist in den ersten drei Gruppen, die auch histologisch stärker betroffen sind, eingeschränkt (Tab.4). Sowohl der Harnstoff- als auch der Kreatininwert sind deutlich erhöht (Tab.4). Das histologisch sichtbare Infiltrat erscheint relativ wenig ausgeprägt für den erhöhten Serumharnstoff in der Gruppe der mit IFA immunisierten Tiere.

Zusammenfassung

Eine Höhere Mykobakteriendosis im CFA führt bei mit STBM immunisierten BN-Ratten zu einer stärker ausgeprägten TIN. Nach Immunisierung mit 4 mg STBM und CFA-Dosen von 0.01 bis 10 mg *M.tuberculosis* sieht man bei allen Tieren eine diffuse anti-TBM-Ak-Ablagerung im Nierencortex. Der anti-TBM-Ak-Titer hat bei allen Tieren die gleiche Höhe. Eine Dosis von 0.01 mg *M.tub.* im CFA ruft keine TIN hervor, man findet jedoch diffuse anti-TBM-Ak-Ablagerungen.

Zu 3.1.3 TIN bei Lewis-Ratten

Aus den oben beschriebenen Versuchen (3.1.1 und 3.1.2) folgt, daß sowohl eine STBM-Dosis von 0.4 mg als auch eine Mykobakteriendosis von 10 mg zur maximalen Ausprägung der TIN führen. Bei den in Versuch 3.1.1 verwendeten Lewis-Ratten konnte keine TIN induziert werden. Der im folgenden beschriebene Versuch soll die Frage beantworten, ob die Ursache dafür eine zu geringe Dosis war. Dazu wird die bei BN-Ratten maximal stimulierende Dosis von *M.tuberculosis* und STBM zusammen verwendet. Außerdem wird eine Gruppe von Lewis-Ratten nach der von Sugisaki beschriebenen Methode immunisiert (37).

TABELLE 4

Zahl d. Tiere	Dosis (mg) M. tub.	ant-TBM-Ak-Titer	Harnstoff (mg/100ml)	Kreatinin (mg/100ml)
3	10	1:81	192.6 (s= 95.18)	1.55 (s=0.54)
3	1	1:81	201.4 (s= 21.26)	2.0 (s=0.20)
3	0.1	1:81	106.2 (s= 53.40)	1.3 (s=0.36)
3	0.01	1:243	29.1 (s= 2.17)	0.9 (s=0.02)
3	0	1:243	91.1 (s= 33.17)	1.0 (s=0.06)
3	Kontrollle	0	40.1 (s= 9.61)	1.0 (s=0.12)

Versuchsaufbau

6 Lewis-Ratten werden mit 0.4 mg STBM in CFA mit 10 mg M.tuberculosis immunisiert. Außerdem bekommen die Tiere 0.5 ml PTA. Nach 13 Tagen wird die linke Niere entfernt.

Eine zweite Gruppe von drei Tieren wird unter den Versuchsbedingungen von Sugisaki immunisiert. Sowohl PTA als auch CFA werden in der von ihm angegebenen Konzentration gespitzt:

PTA mit 180×10^6 Keimen B.pertussis/ml
(sonst 30×10^9 /ml)

CFA mit 10 mg Mykobakterien/ml
(sonst 0.5 mg/ml)

Die nach dem Verfahren von Sugisaki mit homologem Antigen frisch hergestellte Suspension der Ratten-TBM wird sofort verwendet. 0.1 ml werden mit CFA vermischt in die Hinterpfoten gespritzt, 0.2 ml intraperitoneal. Außerdem werden 0.1 ml PTA s.c. in die Hinterpfoten injiziert. Nach 14 Tagen werden die Tiere nephrektomiert.

Ergebnisse

Bei keiner der 9 Lewis-Ratten ist die Niere makroskopisch verändert. Nur die geschwollenen Gelenke der mit 10 mg M.tuberculosis immunisierten Tiere sind auffallend.

Die Histologie erbringt bei allen 9 Tieren einen normalen Befund. Wenige perivaskuläre mononukleäre Zellen müssen als normal angesehen werden.

Die IF ist negativ.

Zusammenfassung

Mit der von Sugisaki zur Immunisierung von Lewis-Ratten angewandten Methode läßt sich in diesem Labor keine TIN induzieren. Die aus den vorhergehenden Versuchen als maximal stimu-

lierend bekannten Dosen von STBM und M.tuberculosis erweisen sich bei Lewis-Ratten als wirkungslos.

3.2 Reimmunisierungsexperimente

Ziel der nachfolgenden Experimente ist es, eine chronische TIN durch mehrfache Immunisierung mit einer Ag-Dosis zu erzeugen, die keine akute TIN hervorruft. Im ersten Versuch bleibt diese Dosis konstant, im zweiten wird sie kontinuierlich gesteigert.

3.2.1 Reimmunisierung von BN-Ratten mit STBM, Ag-positiver Ratten-TBM oder Ag-negativer Ratten-TBM

Versuchsaufbau

BN-Ratten werden im STBM oder RTBM immunisiert. Während eine Gruppe von Ratten mit homologer TBM von BN- und BDV-Nieren immunisiert wird, die die zur Ak-Bildung führende Ag-Struktur auf der TBM haben (= Ag-positive TBM), wird für die andere mit RTBM immunisierte Gruppe TBM verwendet, die das zur Ak-Bildung führende Ag nicht besitzt (= Ag-negative TBM). Diese letzte Gruppe umfaßt nur drei Tiere im Gegensatz zu je 4 in den beiden anderen. Die TBM-Einzeldosis beträgt 0.04 mg, welche durch mehrmalige Anwendung zu einer nephritogenen Gesamtdosis aufgebaut wird, die bei einmaliger Gabe zu einer TIN führen würde. Die CFA-Dosis beträgt 0.1 mg, auf PTA wird verzichtet, da eine protrahierte Reaktion angestrebt ist. Nach 26 Tagen erfolgt eine Biopsie der rechten Niere und die erste Blutabnahme. Die Tiere werden in der Folge mit der gleichen Dosis der jeweiligen TBM in wöchentlichem Abstand über 9 Wochen reimmunisiert mit wechselnden Injektionsorten am Bauch und auf dem Rücken. Gleichzeitig wird jeweils wöchentlich Blut abgenommen. Nach 47 Tagen (vor der 4. Reimmunisierung)

wird die linke Niere biopsiert. Nach 92 Tagen (7 Tage nach der 9. Reimmunisierung) werden die Ratten halbseitig nephrektomiert. Danach werden alle Tiere in der gleichen Weise mit 4 mg STBM in 0.2 ml CFA mit 0.5 ml PTA behandelt. 14 Tage später wird die andere Niere entfernt und Blut abgenommen.

Ergebnisse

Im Verlauf von mehr als drei Monaten wird zu 4 Zeitpunkten (Tag 26, 47, 92 und 14 Tage nach der Reimmunisierung mit 4 mg STBM) das makroskopische Aussehen der Nierenoberfläche festgestellt. Bei den ersten drei Inspektionen sehen bei allen Tieren die Nieren normal aus. Auch nach der Reimmunisierung aller Tiere mit STBM ist entgegen den sonst erzielten Ergebnissen nur bei einem Tier die Nierenoberfläche verändert. Diese Niere zeigt die für die TIN typischen größeren, erhabenen konfluierenden Flecke. Das Tier gehört zur Gruppe der mit Ag-positiver RTBM immunisierten Ratten.

Auch histologisch ist bei den Biopsien kein Infiltrat nachweisbar. Ebenfalls normal waren die nach 92 Tagen entfernten Nieren. Einige kleine Herde mit Rundzellen, die nicht größer als ein bis zwei Nephroneneinheiten sind und nahe der Markrindengrenze liegen, können nicht im Sinne einer TIN gedeutet werden. Nur drei von 11 der 14 Tage nach der Reimmunisierung mit 4 mg STBM entfernten Nieren weisen einen positiven Befund auf. Am stärksten ist die Niere des Tieres betroffen, die schon makroskopisch Zeichen einer TIN aufweist. Hier sind subkapsulär konfluierende, granulomatöse Herde mit Riesenzellen und auch Granulozyten sichtbar. Von den anderen beiden Tieren ist eines auch mit Ag-positiver RTBM immunisiert, das andere mit STBM. Bei letzterem ist nur ein kleiner Herd ohne Riesenzellen von zwei Nephronen Ausdehnung zu sehen, beim ersten sind mehrere Herde dieser Art nachweisbar.

Die direkte IF zeigt in der ersten Biopsie nach 26 Tagen bei den mit STBM oder Ag-positiver RTBM immunisierten Tieren eine im allgemeinen schwache, fokal jedoch stark positive Membranfluoreszenz mit anti-IgG. Ein Unterschied zwischen den mit STBM und den mit Ag-positiver RTBM immunisierten Ratten ist nicht festzustellen. C3 ist nicht nachweisbar.

Bei der zweiten Biopsie nach 47 Tagen ist die TBM aller mit STBM oder Ag-positiver RTBM immunisierten Tiere diffus mit anti-IgG anfärbbar. Allerdings sind Helligkeitsunterschiede mit fokaler Betonung sichtbar. Mit anti-C3 ist die IF negativ.

Die nach 92 Tagen gewonnenen Nephrektomiepräparate sind in den beiden oben erwähnten Gruppen mit IgG anfärbbar, Intensitätsunterschiede sind kaum noch vorhanden. C3 ist nicht nachweisbar.

Alle mit Ag-negativer TBM immunisierten Tiere weisen keine TBM-Ablagerungen an den Tubuli auf.

Zwei Tiere (eines mit STBM, eines mit Ag-negativer RTBM) weisen eine deutliche Fluoreszenz der GBM auf, die besonders im letzten Fall auffallend ist.

14 Tage nach der Reimmunisierung mit 4 mg STBM ist die IF bei allen Ratten diffus positiv mit anti-IgG. Die GBM ist bei den gleichen Tieren wie oben positiv. Mit anti-C3 weist nur die auch makroskopisch veränderte Niere eine Fluoreszenz auf.

Der anti-TBM-Ak-Titer beträgt bei den mit STBM und den mit Ag-positiver RTBM immunisierten Tieren nach 40 und nach 60 Tagen beide Male 1:27, bei den mit Ag-negativer RTBM immunisierten Ratten bleibt der Test negativ. Nach der Immunisierung aller Tiere mit 4 mg STBM beträgt er in der STBM-Gruppe 1:243, in den anderen beiden Gruppen 1:729. Ein Titerunterschied zwischen dem Tier, das an einer sichtbaren TIN erkrankt

war, und den anderen Tieren der Gruppe besteht nicht.

Die Nierenfunktion ist bei allen Blutabnahmen, gemessen am Serumharnstoff, bis auf eine Ausnahme normal. Einzig das von einer TIN befallene Tier hat bei der Blutung 14 Tage nach der letzten Immunisierung einen Harnstoffwert von 103 mg/100 ml.

Zusammenfassung

Nach wiederholter Injektion von Ag-positiver RTBM und STBM, die als Einzeldosis keine TIN induzieren, tritt auch dann keine TIN auf, wenn eine Gesamtdosis appliziert ist, die bei einmaliger Gabe zur TIN führt. Bei der nachfolgenden Immunisierung mit 4 mg STBM erkrankten nur zwei statt der erwarteten 11 Tiere an einer TIN. Der gleiche Effekt wird bei vorheriger wiederholter Immunisierung mit Ag-negativer RTBM beobachtet. Die negative Histologie ist bei allen Tieren mit einem erhöhten anti-TBM-Ak-Titer gekoppelt.

3.2.2 Reimmunisierung von BN-Ratten mit STBM, Ag-negativer-RTBM, CFA und Leber-Ag in steigender Dosis

Aus dem vorhergehenden Versuch geht hervor, daß BN-Ratten bei wiederholter Immunisierung mit TBM zwar anti-TBM-Ak bilden, meistens jedoch keine TIN bekommen. Nach der Immunisierung mit Ag-negativer RTBM treten beidarauffolgender Immunisierung mit STBM zwar anti-TBM-Ak auf, jedoch keine TIN. Ob dieser Effekt durch CFA allein oder durch andere Ag auf der TBM hervorgerufen wird, ist nicht klar. Hier soll versucht werden, mit steigender Dosierung eine TIN zu induzieren.

Versuchsaufbau

4 an Alter und Geschlecht gleiche Gruppen zu je 10 Ratten werden gebildet. Die erste Gruppe wird mit STBM immunisiert, die zweite mit Ag-negativer RTBM, die dritte nur mit CFA ohne TBM und die 4. mit einem aus Leber gewonnenen Ag. Die Ag-Dosis der einzelnen Immunisierungen geht aus Tab.5 hervor. Das jeweilige Ag wird in steigender Dosierung verabreicht, um in den Bereich einer Dosis zu kommen, die sonst schon bei einmaliger Gabe eine TIN hervorruft. Der Injektionsort wechselt am Bauch und am Rücken. Bei der letzten Immunisierung werden alle Tiere mit 4 mg STBM in 0.2 ml CFA mit 0.5 ml PTA immunisiert, nachdem die linke Niere entfernt wurde. 16 Tage später findet eine erneute Inspektion der Nieren statt.

Ergebnisse

70 Tage nach der ersten Immunisierungsserie sind die Nieren aller Ratten makroskopisch normal. Eine einzelne Narbe auf der Niere älterer Tiere muß als unspezifische Altersveränderung gedeutet werden. Auch nach der letzten Immunisierung mit der sonst in praktisch allen Fällen zu einer TIN führenden STBM-Dosis weist keines der Tiere aus der ersten und zweiten Gruppe eine Nierenveränderung auf. Auch die 4. Gruppe der mit Leberantigen immunisierten Ratten hat normale Nieren. Bei den mit CFA ohne zusätzliches Ag behandelten Tieren jedoch entwickeln 7 von 10 eine makroskopisch sichtbare TIN. Bei 5 Tieren sind die Nieren blaßgrau und geschwollen, bei zwei sind sie ganz von großen, gelblichen Flecken bedeckt.

Zusammenfassung

Reimmunisierung von BN-Ratten mit STBM in steigender Dosierung ruft keine makroskopisch sichtbare TIN hervor, auch wenn die Dosis in einen Bereich kommt, wo einmalige Gabe zur TIN führen würde. Die Ausbildung einer TIN durch 4 mg STBM kann auch

TABELLE 5

Anzahl der Immunisierungen	1	2	3	4	5	6	7	8
Tag	1	20	27	35	55	63	70	82
Dosis der je- weiligen Ag (mg)	0.04	0.06	0.06	0.08	0.1	0.2	0.4	4 STBM alle Tiere
CFA-Menge (ml)	0.1	0.15	0.15	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2 +0.5 ml PTA

verhindert werden, indem vorher Ag-negative RTBM oder Leger-Ag in steigender Dosierung injiziert werden. Bei vorheriger Injektion von CFA ohne zusätzliches Ag entwickeln 7 von 10 Tieren bei STBM-Stimulation eine makroskopisch sichtbare TIN.

3.2.3 Reimmunisierung nach Transplantation

Dieser Versuch, der thematisch hier einzuordnen ist, wird zum besseren Verständnis im nächsten Abschnitt behandelt.

3.3 Nierentransplantation zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung

Die TIN ist ein akutes Ereignis, ihre Aktivität nimmt im Lauf der folgenden Woche stark ab. Anti-TBM-Ak sind in dieser Zeit unverändert nachweisbar. Durch die Transplantation einer normalen Niere in ein Tier mit TIN läßt sich ausschließen, daß von der Niere abhängende Faktoren für die Abnahme der Aktivität verantwortlich sind. Eine Transplantation zu verschiedenen Zeitpunkten während des Entzündungsprozesses könnte auf die Frage Antwort geben, ab welchem Zeitpunkt das Transplantat nicht mehr von einer TIN befallen wird.

Versuchsaufbau

BN-Ratten (Mindestalter 6 Monate) werden mit 4 mg STBM in 0.2 ml CFA mit 0.5 ml PTA immunisiert. Die Tiere erhalten 2,3,5,7,8,10,11,13 oder 24 Tage oder an 8 Tagen im Zeitraum von 46 bis 66 Tagen nach der Immunisierung eine normale Niere eines BN-Tieres gleichen Geschlechts (Mindestalter 4 Monate) transplantiert. Die bei der Transplantation entfernte Niere des Empfängers wird makroskopisch, histologisch und immunhistologisch untersucht. 14 Tage nach der Transplantation

werden die andere eigene Niere und das Transplantat herausgenommen und ebenso untersucht. Bei den nach dem 46. Tag operierten Ratten werden bei der Transplantation beide Nieren entfernt. Die Transplantate werden 14 Tage später biopsiert, jedoch nicht herausgenommen. (Diese Tiere werden weiter im Reimmunisierungsversuch verwendet.) Die Zahl der jeweils operierten Tiere ist Tab.7 zu entnehmen. Ab dem 11. Tag wird pro Tag nur noch ein Tier operiert.

4 Tieren wird ein oder zwei Tage vor der Immunisierung anstelle der eigenen gesunden eine andere BN-Niere implantiert, um den Einfluß der Operation auf eine Ausprägung der TIN festzustellen. Das Abklemmen der großen Bauchgefäße während der Operation führt zu zeitweiliger Verminderung des Blutflusses zu den Hinterpfoten und den paraaortalen Lymphknoten. Um diesen Einfluß auf die Immunreaktion zu untersuchen, wird eine Gruppe von drei Tieren gebildet, denen drei Tage nach der Immunisierung für 50 min. - die der bei der Operation auftretenden Ischämiezeit entsprechen - die großen Bauchgefäße abgeklemmt werden. Aus dem gleichen Grunde wird eine Serie von Tieren paranuchal immunisiert. Bei einer anderen Gruppe von zwei Tieren wird zwei Tage nach der Immunisierung die Kapsel einer Niere entfernt, um zu sehen, ob dieser Vorgang die TIN beeinflusst.

Ergebnisse

Eigene Nieren bei der Transplantation (Tab.6):

Makroskopisch sind die vor dem 8. Tag nach der Immunisierung entfernten Nieren immer normal. Bei den beiden am 8. Tag operierten Tieren sind die für die TIN typischen kleinen, erhabenen, gelben Punkte zu sehen, desgleichen bei den am 10., 11., 13. und 19. Tag operierten Ratten. Die Ausnahme bilden zwei am 10. Tag operierten Tiere, deren Nieren normal sind.

TABELLE 6

Immunisierung (Tg vor Trpl)	Bei der Transplantation entfernte Niere	
	<u>makroskopisch</u>	<u>mikroskopisch</u>
2,3,5,7	OB	OB
8	fokale TIN	PMN vereinzelt Rundzellen
8	fokale TIN	PMN, RZ vereinzelt
10	fokale TIN	PMN subkapsulär
10	OB	OB
10	OB	OB
11	fokale TIN	PMN subkapsulär
13	fokale TIN	
19	fokale TIN	
46	diffuse Narben	fokal PZ
47	diffuse Narben	fokal PZ, Atrophie der Tubuli
48	diffuse Narben	ø
49	diffuse Narben	GR,PZ subkapsulär
50	diffuse Narben	GR,PZ subkapsulär
64	Narben	PZ, Tubulusatrophie
65	diffuse Narben	PZ
66	Narben	PZ

Abkürzungen: OB = normal
 PMN = Granulozyten
 RZ = Riesenzellen
 PZ = Plasmazellen
 GR = Granulome

Alle Nieren der nach dem 46. Tag operierten Tiere weisen Narben auf. Sie sind durch die vielen kleinen Narben der abgelaufenen TIN apfelsinenschalenartig verändert.

Auch histologisch ist bis zum 7. Tag keine Veränderung feststellbar mit Ausnahme des submukösen granulozytären Infiltrates einer Ratte, das als Pyelonephritis zu betrachten ist. Alle vom 8. bis zum 19. Tag herausgenommenen Nieren sind im Sinne einer TIN verändert mit Ausnahme eines am 10. Tag operierten Tieres, dessen perivaskuläre Rundzellinfiltrate für die Diagnose einer TIN nicht ausreichend sind.

Die IF zeigt bis zum 7. Tag keine IgG-Ablagerungen an der TBM. Die an diesem Tag fokalen Ablagerungen gehen bis zum 10. Tag in die diffuse lineare IgG-Ablagerung über, die von diesem Zeitpunkt ab bei allen Tieren gesehen wird. Der Nachweis von C3-Ablagerungen, der mit den schon früher beschriebenen Schwierigkeiten verbunden ist, gelingt nur bei einem am 11. Tag operierten Tier.

Eigene Nieren nach der Transplantation

Makroskopisch sind 14 Tage nach der Transplantation von 21 Nieren drei normal (Tab.7), nämlich bei den zwei am 10. Tag operierten Tieren, die schon bei der Transplantation normale Nieren aufwiesen, und bei einer am dritten Tag operierten Ratte. Die anderen Nieren sind wie sonst auch bei der TIN verändert, in 5 Fällen sogar diffus geschwollen.

Histologisch läßt sich nur bei 15 der 19 Ratten, die makroskopische Nierenveränderungen haben, eine TIN eindeutig diagnostizieren. Eines der makroskopisch normalen Tiere weist in der Histologie für die TIN typische Veränderungen auf (Tab.7). Von den 5 makroskopisch schwer befallenen Nieren zeigen 4 ein diffuses, bis an die Markrindengrenze reichendes Infiltrat.

TABELLE 7

Immunisierung (Tg vor Trpl)		14 Tage nach der Transplantation			
		Eigene Nieren		Transplantate	
		<u>makroskop.</u>	<u>mikroskop.</u>	<u>makroskop.</u>	<u>mikroskop.</u>
					beide IF
2		fokale TIN	PMN, GR, RZ keilförmig	dick weiß	Nekrose Thrombose
2		fokale TIN	PMN, GP, PZ keilförmig	OB	PZ Tuberkulose, Nekrose
3		OB	OB	OB	diffus
3		diffuse TIN	PZ, GP subkapsulär	fokale TIN	GP ausgedehnt
3		diffuse TIN	PMN, GR, RZ ausgedehnt	fokale TIN	PMN, GP, PZ ausgedehnt
3		fokale TIN	OB Punktblinder	dick weiß	Nekrose Thrombose
3		fokale TIN	Herz PMN	OB	diffus
3		fokale TIN	Herz PMN	OB	diffus
-		diffuse TIN	PMN, GP, PZ ausgedehnt	OB	Tuberkulose, Nekrose Gangl. OB
-		diffuse TIN Geshwulsten	PMN, GP, PZ ausgedehnt	OB	Herz PMN Tuberkulose, Nekrose
-		fokale TIN	OB	OB	diffus
3		diffuse TIN	GP, PZ ausgedehnt	GP, PZ Nekrose	diffus

9	diffuse TIN	GR, RZ	diffuse	diffuse	diffuse
10	fokale TIN	GR, RZ	diffuse	diffuse	diffuse
10	diffuse TIN	GR, RZ	diffuse	diffuse	diffuse
11	fokale TIN	GR, RZ	diffuse	diffuse	diffuse
11	fokale TIN	GR, RZ	diffuse	diffuse	diffuse
13	fokale TIN	GR, RZ	diffuse	diffuse	diffuse
19	fokale TIN	GR, RZ	diffuse	diffuse	diffuse
46, 47, 48 49, 50	diffuse TIN	GR, RZ	diffuse	diffuse	diffuse
64, 65, 66	diffuse TIN	GR, RZ	diffuse	diffuse	diffuse

Zeichenerklärung: GR=Granulom, RZ=Riesenzelle, PZ=Plasmazelle, PMN Granulozyt, OB normal

1) bei diesen Tieren wurden histologisch nur Biopsien beurteilt

Alle anderen Nieren haben ein für die TIN typisches, mehr oder weniger ausgedehntes Infiltrat. Bei den restlichen 4 Tieren, die makroskopisch von einer fokalen TIN befallen scheinen, lassen sich jeweils nur ein Granulozyten- oder Rundzellherd nachweisen. Die Gründe für diese Divergenz sind nicht bekannt. Da immer der gleiche Mittelteil der Niere für die Histologie verwendet wird, unabhängig von der Lage der Veränderungen, ist es möglich, wenn auch unwahrscheinlich, daß die Stellen mit Infiltrat nicht mit angeschnitten wurden. Alle 4 Tiere stammen aus der gleichen Immunisierungsserie (nicht alle Tiere wurden gleichzeitig immunisiert), jedoch treten auch in ihr Tiere mit einer stark ausgeprägten TIN auf.

Die IF ist ohne Ausnahme mit anti-IgG diffus positiv. Bei zwei Tieren geht die IF mit anti-C3 über das normale Maß hinaus.

Bei den Transplantationen zu einem späteren Zeitpunkt nach der Immunisierung wurden beide Nieren entfernt, sodaß hier keine Angaben vorliegen.

Transplantate

Makroskopisch sind 14 Tage nach der Transplantation nur 4 Transplantate verändert. Zwei davon sind nekrotisch und nur zwei weisen die für die TIN typischen Veränderungen auf. Eine wahrscheinlich durch Stauung bedingte Verhärtung der Nieren tritt dagegen öfter auf.

Histologisch läßt sich bei den nekrotischen Transplantaten eine Nierenvenenthrombose nachweisen. Die beiden makroskopisch von einer fokalen TIN befallenen Transplantate wurden am 3. und 5. Tag in Ratten transplantiert, deren eigene Nieren von einer schweren TIN befallen sind (Tab.7). Die Transplantate zeigen histologisch eine ausgedehnte TIN mit Granulomen und

Riesenzellen. 7 weitere, makroskopisch normale Transplantate weisen in der Histologie Zeichen einer Entzündung auf: Ein am zweiten Tag nach der Immunisierung operiertes Tier hat kleinere tubuloatrophische Herde mit einem plasmazellreichen Infiltrat, die Niere eines am 7. Tag operierten Tieres einen kleinen granulomatösen Herd. Diese Befunde reichen zur sicheren Diagnose einer TIN nicht aus. Zwei am 8. Tag nach der Immunisierung operierte Ratten haben kleine granulomatöse Herde mit Riesenzellen und zum Teil erheblicher Tubulusatrophie. Wenn auch sehr wenig ausgeprägt, so bieten sie doch die für die TIN typischen Läsionen. Auch ein am 10. Tag operiertes Tier hat ein von einer TIN befallenes Transplantat mit Riesenzellen und Tubulusatrophie. Bei zwei anderen am 10. Tag operierten Tieren sind nur in zusätzlichen, von anderen Teilen der Niere angefertigten Schnitten je ein für die TIN typischer Herd feststellbar. Bei den 8 restlichen Rattennieren ist die Histologie normal. Auch die Biopsien der 46 bis 66 Tage nach der Immunisierung transplantierten Nieren sind normal.

Das gehäufte Auftreten atrophischer Tubuli in den Transplantaten findet keine befriedigende Erklärung. Insgesamt tritt also eine TIN im Transplantat nur in sehr viel schwächerer Form auf, die in keiner Weise mit dem Befund an der eigenen Niere zu vergleichen ist. Die beiden nur in zusätzlichen Schnitten festgestellten Entzündungen sind, da sie außerhalb der üblichen Probennahme entdeckt wurden, eigentlich in diesem Rahmen als negativ zu bewerten.

Die IF ist bei allen Transplantaten diffus positiv mit anti-IgG, mit anti-C3 immer negativ.

Kontrolltiere

Bei den 4 Tieren, die ein und zwei Tage vor der Immunisierung ein Nierentransplantat bekamen, ist die TIN 14 Tage nach der Immunisierung an der eigenen Niere und am Transplantat sowohl makroskopisch als auch histologisch gleich stark ausgeprägt. Die gesamte Nierenrinde ist diffus infiltriert.

Die Nieren der drei Tiere, denen drei Tage nach der Immunisierung für 50 min. die großen Bauchgefäße abgeklemmt wurden, zeigen makroskopisch alle die für die TIN typischen Läsionen. Auch histologisch sind konfluierende, riesenzellhaltige, granulomatöse Herde vorhanden.

Die Nieren der zwei Tiere, die vor der Immunisierung dekapuliert wurden, haben 14 Tage nach der Immunisierung die gleichen, für die TIN typischen Oberflächenveränderungen wie die Gegenseite. Auch in der Ausprägung ist kein Unterschied erkennbar. Histologisch fällt bei diesen Nieren neben der diffusen granulomatösen Entzündung eine deutliche Bindegewebsvermehrung mit Tubulusatrophie auf.

Die Ausprägung der TIN bei den paranuchal immunisierten Ratten unterscheidet sich nicht von der, die bei den an den Hinterpfoten immunisierten Tiere auftrat.

Zusammenfassung

Sowohl bei den eigenen Nieren als auch bei den Transplantaten trat die TIN nicht in der erwarteten Stärke auf. Es besteht eine deutliche Diskrepanz zwischen der Ausprägung der TIN bei den eigenen Nieren und den Transplantaten. Diese sind ohne Ausnahme deutlich weniger entzündet. Keine der 11 oder mehr Tage nach der Immunisierung transplantierten Nieren weist eine TIN auf. Die IF ist ohne Ausnahme in den eigenen und transplantierten Nieren gleich diffus positiv.

3.3.1 Reimmunisierung nach Transplantation (vgl. 3.2.3)

In diesem Versuch wird ein Teil der Nierentransplantierten Ratten reimmunisiert. 8 Ratten haben in einem Zeitraum von 46 bis 60 Tagen nach der Immunisierung ein Nierentransplantat erhalten. Nach der Biopsie der Transplantate werden die Tiere 10 Tage später mit 4 mg STBM in 0.2 ml CFA mit 0.5 ml PTA reimmunisiert. Die Emulsion wird bei der Hälfte der Tiere in die Hinterpfote gespritzt, bei der anderen in die Bauchhaut. Nach weiteren 17 Tagen werden die Transplantate entfernt und untersucht.

Ergebnisse

Makroskopisch ist das Aussehen der Niere durch die Transplantation und die Biopsie verändert. Bei einer Niere ist die Oberfläche durch die starke Kapselfibrose nach der Transplantation nicht mehr zu beurteilen, zwei andere sind etwas gestaut. Bis auf ein paar kleine gelbe Punkte auf einem Transplantat, die jedoch beim Schneiden nicht die für die TIN typische Keilform aufweisen, sind die Nieren normal.

Histologisch weisen 5 der 8 Nieren Entzündungsherde auf, die drei anderen sind normal, abgesehen von einem Gebiet mit atrophischen Tubuli bei einer Niere. 4 der 5 Nieren zeigen die für die TIN typischen subkapsulären, granulomatösen Entzündungsherde mit Riesenzellen. In einem Fall sind die Herde konfluierend und plasmazellreich. Bei der 5. Niere ist eine plasmazellreiche Entzündung mit starker Fibrose, jedoch ohne Granulome zu sehen.

Die IF trägt, da sie bereits vor der Reimmunisierung positiv war, zur Beurteilung nichts bei.

Zusammenfassung

Reimmunisierung von BN-Ratten, deren erste Immunisierung mindestens 46 Tage zurückliegt, führt bei 5 von 8 Tieren zu einer erneuten TIN in 10 Tage alten Nierentransplantaten.

3.4 Transferversuch

BN-Ratten, denen mit dem Serum von TIN-erkrankten Tieren anti-TBM-Ak übertragen wurden, erkrankten nach Untersuchungen von Krieger (9) nicht an einer TIN trotz diffuser linearer Ak-Ablagerungen an der TBM. Als mögliche Erklärung bietet sich an, daß die für die Versuche verwendete Serummenge zu gering war, obwohl auch andere Ursachen denkbar sind. So ist möglich, daß bei Ratten im Gegensatz zu Meerschweinchen die Übertragung von Zellen zur Auslösung der TIN notwendig ist. Vom Meerschweinchen ist bekannt, daß nach Immunisierung mit TBM Lymphknotenzellen *in vitro* stärker suppressiv wirken als Peritonealexsudatzellen (17). Die Übertragung dieser Ergebnisse bei der Ratte *in vivo* wird hier untersucht.

5 BN-Ratten werden anti-TBM-Ak übertragen. Das dafür verwendete Serum stammt von 40 Lewis-1N-Ratten. Die von diesen Tieren gebildeten anti-TBM-Ak werden nicht auf der eigenen Niere abgelagert, so daß das mit dem Serum gewonnene Ak-Spektrum nicht verändert ist. Der Ak-Titer beträgt 1:81. Außerdem werden 50 ml BN-Serum mit einem anti-TBM-Ak-Titer von 1:243 verwendet. Jede Empfängerratte erhält 50 ml anti-TBM-Ak haltiges Serum in zwei intraperitonealen Injektionen à 25 ml an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. 4 Ratten bekommen zusätzlich Zellen übertragen, pro Empfänger werden drei Spender verwendet. Die Zellen werden am zweiten Tag *i.v.* injiziert. Zwei der 4 Tiere werden nur Peritonealexsudatzellen, den anderen zwei dazu noch Lymphknotenzellen übertragen. Eine weitere BN-Ratte bekommt nur Peritonealexsudatzellen ohne Serum.

Nach 6 bis 8 Tagen werden die Nieren das erste Mal inspiziert, nach 16 bis 18 Tagen wird die linke Niere herausgenommen, nach 31 bis 33 Tagen die rechte. Außerdem werden zur Kontrolle nach 16 bis 18 Tagen die Nieren der Tiere angesehen, deren Peritonealexsudatzellen verwendet wurden.

Ergebnisse

Die Menge der übertragenen Zellen variiert, sie reicht von 10^7 Zellen in den Fällen, in denen nur Peritonealexsudatzellen übertragen wurden, bis zu 6×10^8 Zellen bei den Tieren, denen auch Zellen aus den Lymphknoten übertragen wurden.

6 bis 8 Tage später sind alle Nieren makroskopisch normal, denselben 16 bis 18 und 31 bis 33 Tage später.

Zusammenfassung

Eine Übertragung der TIN bei BN-Ratten durch Serum immunisierter Tiere erweist sich als nicht möglich. Der Transfer von Peritonealexsudat- und Lymphknotenzellen ist weder allein noch zusammen mit Serum krankheitsauslösend.

4. DISKUSSION

Das experimentelle Modell der TIN ist seit 1971 bekannt (34). Durch die weiteren Arbeiten von Rudofsky mit Meerschweinchen sind die für die Entstehung der Nephritis bei dieser Tierart notwendigen Faktoren weitgehender erforscht als bei der Ratte. So war es möglich, durch Übertragung von Serum kranker Tiere eine identische TIN bei den Empfängern zu erzeugen. Diese war so ausgeprägt, daß sie in 4 von 9 Fällen tödlich endete (35). Die Krankheit konnte sich nicht bei Empfängertieren ausbilden, deren Complementspiegel im Blut durch die Gabe von Kobragift gesenkt war (25). Die Höhe des C4-Spiegels war nicht von Bedeutung für die Ausbildung der TIN beim Meerschweinchen, da Tiere mit einem genetischen C4-Defekt genauso von der Krankheit betroffen wurden (24). In einer weiteren Arbeit stellte Rudofsky fest, daß Antiseren gegen intaktes C3 nur an der TBM von einer TIN befallener Tiere gebunden wurden (28). Passiv zugeführtes IgG und eigenes Complement, die an der TBM von lethal bestrahlten Meerschweinchen ohne Leukozyten im Blut nachgewiesen werden konnten, bewirkten keine sichtbaren Tubulusschäden (26). Knochenmarktransplantation bei so behandelten Tieren führte dann zu einer TIN. Transfer von Lymphozyten dagegen induzierte keine TIN (27). So ergibt sich beim Meerschweinchen das Bild einer Ak-vermittelten TIN, die durch anti-TBM-Ak übertragen werden kann, bei der aber Zellen aus dem Knochenmark für den Gewebeschaden unerläßlich sind. Gegen einen zellvermittelten Immunmechanismus spricht auch, daß die Empfängertiere nach der Bestrahlung im Thymus, der Milz und den Lymphknoten kaum noch Lymphozyten besaßen (27). Die Übertragung der TIN durch Lymphozyten ohne anti-TBM-Ak war beim Meerschweinchen nicht erfolgreich (40). Unterstützt wurde diese Feststellung von der Beobachtung, daß Niridazol, ein Antihelminthicum mit stark hemmender Wirkung auf zellvermittelte Immunreaktionen, keinen Einfluß auf die Ausbildung dieser TIN hat (29).

Nach Untersuchungen von Hall an Meerschweinchen vom Stamm XIII führte die anti-TBM-Ak-Übertragung zur Stimulation der anti-TBM-Ak-Bildung beim Empfänger (7). Die Ak-Übertragung führte also zur Immunisierung gegen die eigene TBM. Das Ausmaß der TIN war besonders groß bei den Tieren, die viel eigene anti-TBM-Ak selbst gebildet hatten. Über den zeitlichen Ablauf der Ak-Bildung ist noch nichts bekannt. Da die ersten mononukleären Zellen schon 48 Stunden nach dem Ak-Transfer auftraten, stehen sie aber wohl in keinem Zusammenhang mit dieser Immunreaktion. Die hier beobachtete Korrelation zwischen dem Ausmaß der histologischen Infiltration der Niere und dem anti-TBM-Ak-Titer war früher nicht beobachtet worden (30). Wieweit die Stimulation der Ak-Bildung durch Ak-Übertragung, die als Autoimmunamplifikation bezeichnet wird, von pathogenetischer Bedeutung ist, ist nicht untersucht. Auch ist unbekannt, ob dieses Phänomen bei anderen Tierarten auftritt.

In indirekter Weise wird die Bedeutung der anti-TBM-Ak bei der TIN des Meerschweinchens dadurch unterstrichen, daß die Injektion von anti-Idiotyp-Ak zusammen mit Immunisierung gegen TBM zu einer wesentlich schwächer ausgeprägten TIN führte (5). Die anti-Idiotyp-Ak supprimierten die Bildung von anti-TBM-Ak auf noch unbekannte Weise (z.B. durch Zerstörung des entsprechenden B-Zell-Klones oder durch Stimulation einer spezifischen T-Suppressorzelle). Durch diesen Mechanismus wäre aber auch die Inhibition anderer, eventuell nicht anti-körperabhängiger zellulärer Faktoren möglich.

Neilson untersuchte die zellulären Immunvorgänge bei der TIN des Meerschweinchens. Er beobachtete 40 Tage nach der Immunisierung mit TBM eine Hautreaktion von Spättyp gegen TBM (17). T-Zellen immunisierter Tiere wirkten in vitro zytotoxisch auf fetale Meerschweinchenieren (18) und sezernierten einen zur Fibroblastenproliferation führenden Faktor (19). Eine Verbindung zwischen zellvermittelten und Ak-vermittelten Vorgängen bei der TIN stellte er durch den Nachweis einer Ak-vermittelten

zellulären Zytotoxizität als Effektormechanismus der TIN her (20). Die Tatsache, daß die TIN des Meerschweinchens durch anti-TBM-Ak und nicht durch Lymphozyten übertragen werden kann, bleibt unübersehbar.

Im Vergleich zur Situation der TIN beim Meerschweinchen interessieren in dieser Arbeit die etwas anders gelagerten, aber noch weniger erforschten Verhältnisse bei der Ratte. Über die TIN bei der Ratte berichtete zuerst Sugisaki 1973 (36). BN-Ratten zeigten 9 bis 11 Wochen nach der Immunisierung mit einer Suspension aus homogenisierten Nieren von Sprague-Dawley-Ratten ein diffuses Infiltrat der Nierenrinde aus mononukleären Zellen und Riesenzellen. Lehmann erzeugte eine TIN beim gleichen Rattenstamm durch Immunisierung mit TBM von Rindernieren (13) und untersuchte die Reaktion anderer Rattenstämme. Zwei Stämme bildeten zwar Ak, diese lagerten sich jedoch nicht an der Niere ab (Lewis, Wistar-Furth, Maxx). Krieger untersuchte die genetische Abhängigkeit weiter und stellte fest, daß zwei Stämme zwar anti-TBM-Ak an ihrer Niere ablagerten, jedoch histologisch ein normales Bild boten (DA, BDV). Bei einem dritten Stamm (AVN) erkrankte nur die Hälfte der Tiere an einer TIN, während alle Tiere anti-TBM-Ak an ihren Nieren ablagerten (9). Robertson konnte nur bei BN-Ratten eine TIN erzeugen, bei 10 anderen Stämmen jedoch nicht (23). Im Gegensatz zu Beobachtungen in unserem Labor war diese jedoch mit einer GN und der Ablagerung von anti-GBM-Ak verbunden. Es ist außerdem möglich, durch Transplantation einer Ag-positiven Niere in solche Tiere, die an ihren Nieren das Ag nicht besitzen, neben der Abstoßungsreaktion anti-TBM-Ak zu erzeugen (14). Deshalb bleibt die zentrale Frage nach der Rolle der anti-TBM-Ak bei der Ratten-TIN.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte im Versuch (3.1.1 und 3.1.2) keine Korrelation des Ak-Titers der BN-Ratten mit der Ausprägung der TIN festgestellt werden. Die Ak-Titer lagen bei den mit verschiedenen Adjuvans- und Ag-Dosen immunisierten Tieren, obwohl sie eine TIN unterschiedlicher Ausprägung entwickelten (Tab.1), bei 1:81 oder 1:243 (Tab.2). Lehmann konnte feststellen, daß der anti-TBM-Ak-Titer der Menge des bei der Elution aus der Niere gewonnenen Ak proportional ist, womit sich der Titer im Serum als Spiegel der an der Niere abgelagerten Ak-Menge erweist (13). Die Stärke der TIN scheint somit nichts mit der Menge der gebildeten und abgelagerten Ak zu tun zu haben. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den von Hall beim Meerschweinchen beschriebenen Befunden. Auch die Aktivität der TIN hängt nicht mit dem Ak-Titer zusammen, da er 50 Tage nach der Immunisierung, wenn die TIN in ein wenig aktives Stadium übergegangen ist (9), nicht abgefallen ist. Die im gleichen Versuch (3.1.1) mit unterschiedlichen TBM-Dosen immunisierten Lewis-Ratten bildeten ebenfalls anti-TBM-Ak, deren Titer dem der BN-Ratten entsprach. Auch bei ihnen war kein Titerunterschied feststellbar (Tab.2). Da die Ak nicht an den Nieren abgelagert werden können, kann man annehmen, daß der Titer im Serum der gebildeten Ak-Menge entspricht. Unterschiedliche Dosen von STBM und Adjuvans führen also unabhängig davon, ob sich eine TIN ausbildet und von welcher Stärke sie ist, zum gleichen anti-TBM-Ak-Titer im Blut. Diese Untersuchungen geben jedoch keinen Aufschluß über die Art der gebildeten anti-TBM-Ak.

In den von einer TIN befallenen Nieren wird C3 abgelagert. Man sieht in diesem Falle in der IF eine ringförmige Fluoreszenz der Tubuli bei der Färbung mit anti-C3. Die auch bei den Kontrolltieren sichtbare nicht ringförmige, sondern nur einzelne Sektoren der TBM betreffende Fluoreszenz ist auf eine unspezifische Reaktion des verwendeten kommerziellen Antiserums zurückzuführen, die auch von anderen Autoren beschrieben wurde (9, 13, 35).

Das unterschiedliche Verhalten des anti-TBM-Ak-Titers von Ratte und Meerschweinchen, das auf eine unterschiedliche Rolle bei der TIN hinweist, könnte mit einem zellulären Infiltrat anderer Zusammensetzung im Interstitium gekoppelt sein. Wenn man die Literatur zur Frage durchsieht, welcher Art die zelluläre Zusammensetzung des interstitiellen Infiltrats beim Meerschweinchen ist, kommt man zu folgenden Gesichtspunkten: Van Zwieten, der das interstitielle Infiltrat beim Meerschweinchen nach Zelltypen ordnete, stellte über 95% mononukleäre Zellen fest, die er aufgrund morphologischer Kriterien überwiegend als Makrophagen charakterisierte (40). Allerdings sind große Lymphozyten mit dieser Methode schlecht von Makrophagen zu unterscheiden. Mit IgG beladene Erythrozyten, die an Fc-Rezeptoren u.a. von Makrophagen binden, lagerten sich an einen Teil der mononukleären Zellen an. Diese könnten jedoch ebenso die von Nielsor bei der Ak-vermittelten zellulären Zytotoxizität beschriebenen Killerzellen sein (20). Granulozyten waren beim Meerschweinchen auch in der ersten Zeit der Zellinfiltration nicht feststellbar.

Bei der BN-Ratte bestand in der ersten Zeit der Infiltration ein bedeutender Anteil der Zellen aus Granulozyten (9). Ihr Anteil nahm in der Folge sehr stark ab zugunsten der mononukleären Zellen. Sugisaki klassifizierte die bei der von ihm beschriebenen TIN bei Lewis-Ratten auftretenden mononukleären Zellen überwiegend als große Lymphozyten mit einigen Makrophagen (37). Solche, nur durch lichtmikroskopische Untersuchungen untermauerten Angaben sind von fraglichem Wert. Langer beschrieb die Umwandlung von Monozyten in Tubulusnähe zu Epitheloid- und Riesenzellen, die peritubulär Granulome bildeten (11).

Auffallend ist das Fehlen von Granulozyten beim Meerschweinchen, zumal dessen TIN durch Ak übertragen werden kann und Granulozyten oft am Ort von Ag-Ak Reaktionen vorkommen. Bei

der Ratte, bei der die Ak-Übertragung erfolglos blieb, kommen dagegen Granulozyten vor.

Im Gegensatz zum Meerschweinchen ist bei der Ratte nicht beschrieben, daß Ak-Übertragung auf ein unimmunisiertes Tier eine TIN entsprechend starker Ausprägung auslöst. Sugisaki beobachtete nach dem Transfer von Serum ein zwar charakteristisches, jedoch nur wenig ausgeprägtes nononukleäres Infiltrat und fokale lineare anti-TBM-Ak-Ablagerungen (36). Weitere Berichte über den erfolgreichen Transfer der TIN durch Serum fehlen aber. Ein Versuch in unserem Labor führte zwar zu diffuser, linearer anti-TBM-Ak-Ablagerung, ein interstitielles Infiltrat konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (9). Der in dieser Arbeit beschriebene, mit der fünffachen Serummenge wiederholte Transferversuch (s.3.4) konnte auch keine makroskopisch sichtbaren Nierenveränderungen erzeugen. Der Ak-Titer des übertragenen Serums lag teilweise bei 1:243, meist jedoch eine Titerstufe niedriger bei 1:81. Durch die Verwendung von Lew.1N-Ratten zur Serumproduktion war gewährleistet, daß nicht anti-TBM-Ak von besonders hoher Affinität vor dem Entbluten des Serumspenders durch dessen eigene Niere herausgefiltert wurden. Die Übertragung von Peritonealexsudatzellen mit STBM immunisierter BN-Ratten brachten ebenfalls kein makroskopisch sichtbares Ergebnis (Versuch 3.4). Der Zeitpunkt der Zellübertragung entspricht dem von Neilson beim Meerschweinchen beschriebenen und auch dem von Sugisaki bei seinem Versuch mit Lewis-Ratten am besten herausgearbeiteten (37,17). Möglicherweise war die Menge der Peritonealexsudatzellen zu gering (10^7).

Der Nachweis, daß die TIN durch Lymphozyten übertragbar ist, ist nicht gelungen. Die Tiere, die sowohl anti-TBM-Ak als auch Lymphozyten übertragen bekamen, erkrankten nicht an einer makroskopisch sichtbaren TIN. Auch hier kommt die zu geringe Zellzahl oder ein ungeeigneter Zeitpunkt der Zellgewinnung infrage.

Die Annahme, daß sowohl Ak als auch sensibilisierte Lymphozyten für die Übertragung verantwortlich sind, wird durch diesen Versuch nicht gestützt.

Neuere Arbeiten stützen Zweifel, daß allein den anti-TBM-Ak bei der Ratten-TIN Bedeutung zukommt. So führte die wiederholte Injektion von Maxx-Lymphozyten (Maxx-Ratten sind TBM-Ag negativ) in (Maxx-BN) F₁Hybride zwar zur Bildung von anti-TBM-Ak und deren Ablagerung an der TBM, jedoch zu keiner TIN (38). Der Wert dieses Befundes wird durch den niedrigen anti-TBM-Ak-Titer von 1:40, jedoch mit demselben Ergebnis. Rudofsky berichtet in teilweise noch unveröffentlichten Arbeiten über eine bei verschiedenen Mäusestämmen induzierbare TIN (31,32). Nach der Immunisierung mit Kaninchen-TBM entwickelten bestimmte Mäusestämme eine TIN, andere nicht. Alle Stämme bildeten anti-TBM-Ak. Die Höhe des anti-TBM-Ak-Titers unterschied sich bei diesen beiden Gruppen nicht, ausschlaggebend für das Auftreten der TIN war der "Major Histocompatibility Complex". Während die Ak schon nach 14 Tagen an der TBM abgelagert waren, trat ein zelluläres Infiltrat erst nach Wochen auf. Als eine mögliche Erklärung bietet Rudofsky die Autoimmunamplifikation an, die zum Verlust der Toleranz gegen das eigene TBM-Ag geführt habe. Mäuse, die Tumorzellen implantiert bekamen, welche monoklonale anti-TBM-Ak bildeten, lagerten diese zwar an der TBM ab und erreichten im Blut Titer bis zu 1:32000, entwickelten jedoch kein TIN. Auch die Übertragung allogener oder xenogener anti-TBM-Ak war bei demselben Stamm wirkungslos, der bei direkter Immunisierung von einer schweren TIN befallen wurde. Die Vermutung, daß bei Mäusen ein zellulärer Immunmechanismus an der Ausbildung der TIN beteiligt ist, wird durch diese Ergebnisse nahegelegt. Für die Ratte sind ähnliche Untersuchungen nicht bekannt.

Über antikörper-unabhängige zelluläre Immunmechanismen bei der Ratten-TIN liegen nicht viele Ergebnisse vor. Lehmann injizierte Lymphknotenzellen oder eine Kombination von Lymphknoten- und Peritonealexsudatzellen TBM-immunisierter BN-Ratten direkt unter die Nierenkapsel von BN-Ratten (15). Die Zellen wurden jeweils 6,9 oder 13 Tage nach der Immunisierung der Spender gewonnen. Bei den Tieren, die Peritonealexsudatzellen gespritzt bekamen und bei denen, die Lymphknotenzellen vom 13. Tag nach der Immunisierung erhielten, waren eine Woche nach dem Transfer Tubulusschäden sichtbar. Diese waren jedoch immer auf den subkapsulären Bereich am Injektionsort beschränkt. Neben einem invasiven mononukleären Infiltrat lagen atrophische Tubuli mit fibrotischen Arealen und gelegentlich auch Riesenzellen. Es waren keine anti-TBM-Ak an der TBM abgelagert. Es gibt weitere Versuche, im Niereninterstitium einen Zellvermittelten Schaden zu erzeugen, die aber nicht auf der Immunisierung mit TBM beruhen. In der Nierenrinde können auch T-Zell vermittelte Immunreaktionen ablaufen, wenn man ein Fremdantigen unter die Nierenkapsel injiziert. Ratten und Meerschweinchen, die mit Rinder-Gammaglobulin in CFA immunisiert waren, entwickelten ein mononukleäres interstitielles Infiltrat um die Einstichstellen, an denen ihnen hitzeaggregiertes Gammaglobulin in die Niere injiziert worden war (41). Diese Reaktion konnte durch Lymphknotenzellen immunisierter Tiere übertragen werden, sodaß die Empfänger auf eine intrarenale Injektion von Gammaglobulin in gleicher Weise mit der gleichen Intensität reagierten. Außerdem entwickelten die Empfängertiere einen positiven Hauttest vom Spättyp. Auch durch die Injektion fremder Lymphozyten unter die Nierenkapsel kann man bei sensibilisierten Tieren eine solche Lokalreaktion auslösen. DA-Ratten, die durch Hauttransplantation gegen Lewis-Histokompatibilitätsantigene sensibilisiert wurden, entwickelten bei der Injektion von Lewis-Lymphknotenzellen unter die Nierenkapsel eine lokale Graft versus Host Reaktion (1,2).

Es war allgemein angenommen worden, daß Lewis-Ratten nicht von einer TIN befallen werden. Sugisaki beschrieb jedoch 1980 eine TIN bei diesem Stamm, die sich ohne die Ablagerung von anti-TBM-Ak entwickelte (37). Die Tiere wurden mit autologem Nierengewebe immunisiert und entwickelten nach 10 bis 14 Tagen eine TIN mit diffusem Befall der Niere. Lymphknotenzellen immunisierter Spender führten nach Zelltransfer zu einer fokalen TIN, die nach 24 bis 48 Stunden am stärksten ausgeprägt war. Von den im Zeitraum von 4 bis 28 Tagen gewonnenen Lymphknotenzellen erwiesen sich die am 10. Tag entnommenen als am wirksamsten. Auch produzierten diese Zellen bei Inkubation mit Nierenantigen in vitro Migrationsinhibitionsfaktor.

Der Versuch 3.1 in der vorliegenden Arbeit, der bei BN- und Lewis-Ratten die Wirkung verschiedener Adjuvans- und Ag-Dosen untersuchte, sollte zunächst feststellen, ob das Nichtansprechen der Lewis-Ratten eine Frage der Stärke des Stimulus ist. Dies kann jedoch aufgrund der negativen Ergebnisse verneint werden. Auch die genaue Anwendung der von Sugisaki zur Immunisierung von Lewis-Ratten angewandten Methode mit autologem Ag brachte kein anderes Ergebnis. Die Ursache für diese Divergenz ist unklar. Es wäre denkbar, daß mit unterschiedlich reagierenden Rattenstämmen gearbeitet wurde, zumal bekannt geworden ist, daß kommerzielle Lewis-Ratten in den USA genetisch nicht rein sein müssen (22). Auch das würde nicht erklären, warum die TIN bei Sugisaki ohne Bildung von anti-TBM-Ak abläuft. Ein solches experimentelles immunologisches Modell ist nicht bekannt. Das makroskopische Bild der Nieren wird von Sugisaki leider nicht beschrieben.

Bei den BN-Ratten in unserem Labor führte nicht die höchste Dosis des TBM-Ag zur stärksten TIN, sondern die in der Mitte liegende von 0.4 mg. Diese Beobachtung läßt an Verhältnisse wie bei der "high dose tolerance" denken (3,6). Bemerkenswert

ist auch, daß mit IFA und STBM immunisierte Tiere eine stärkere TIN entwickelten als die mit einer geringen Dosis CFA und STBM immunisierten (Tab.4). Wegen der geringen Tierzahl könnte dies ein Zufallseffekt sein. Es bietet sich aber auch der für komplettes Adjuvans beschriebene Suppressoreffekt als mögliche Erklärung an (3,6,42). Die stärkere Adjuvanswirkung von IFA wurde auch bei der Immunisierung von Mäusen mit Rinder-Gammaglobulin beobachtet (4).

In den Versuchen 3.2.1 und 3.2.2 führten wiederholte Injektionen geringer TBM-Dosen nicht zu einer makroskopisch sichtbaren TIN. Auch die darauffolgende Injektion von 0.4 mg STBM, die sonst immer eine sehr schwere TIN hervorrief, blieb ohne Wirkung (Tab.5). Der Effekt kann nicht auf das CFA zurückgeführt werden, da nur mit CFA ohne TBM immunisierte Tiere bei nachfolgender Immunisierung mit STBM an einer TIN erkrankten. Ebenso ist der Effekt nicht durch anti-TBM-Ak oder das entsprechende Ag auf der zur Immunisierung verwendeten TBM hervorgerufen, da mit RTBM ohne das Ag immunisierte Ratten ebenfalls nicht erkrankten. Vorausgehende Immunisierung mit Leber-Ag verhindert ebenfalls die Ausbildung einer TIN. Bei einer Gruppengröße von 10 Tieren ist ein Zufall unwahrscheinlich. Die oben erwähnte unspezifische Suppression durch CFA könnte einen paradoxen Einfluß auf den Bruch der Toleranz gegen TBM haben. Andere Adjuvantien oder die Immunisierung ohne Adjuvans wurden nicht getestet. Aus Versuch 3.2.1 dieser Reihe läßt sich ersehen, daß die Suppression sich aber nicht auf die anti-TBM-Ak-Bildung bezieht. Der Titer entspricht dem im Versuch 3.1.1, was wieder zeigt, daß die TIN nicht mit dem anti-TBM-Ak-Titer korreliert. Die Reimmunisierung nach 60 oder mehr Tagen, die bei Ratten mit Nierentransplantaten im Versuch 3.2.3 durchgeführt wurde, rief eine histologisch sichtbare TIN im Transplantat hervor. Diese war nur sehr schwach ausgeprägt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine chronische TIN mit TBM-Ag in CFA unter Einhaltung großer Abstände zwischen den einzelnen Immunisierungen hervorgerufen werden kann.

Die Transplantation einer nur mit Ak beladenen BN-Niere hatte sich in einem Vorversuch als nicht möglich erwiesen, da zu Beginn der zellulären Infiltration noch nicht genügend Ak an der TBM abgelagert waren. Die Transplantation von normalen BN-Nieren in ein immunisiertes Tier zu verschiedenen Zeitpunkten führte konstant und ohne Ausnahme zu einer geringeren Entzündung im Transplantat, die nur in wenigen Fällen makroskopisch sichtbar war (Tab.6). Die Transplantation selbst, die zu Änderungen des Blutflusses und Lymphabflusses sowie zur Denervierung führt, wurde als Ursache für die geringere TIN-Ausprägung im Transplantat ausgeschlossen, da bei einseitiger Transplantation vor der Immunisierung keine Seitendifferenz in der Ausprägung der TIN auftrat. Auch Unterbrechung der Blutzufuhr zum Immunisierungsgebiet beim Abklemmen der großen Bauchgefäße ließ makroskopisch keine Beeinflussung der TIN erkennen. Die Ursache für die äußerst schwache Ausprägung der TIN im Transplantat bleibt also ungeklärt. Unter diesen Umständen ist es zudem außerordentlich schwierig, einen eventuellen, bestimmten Zeitpunkt festzulegen, zudem bei Transplantationen der Pathomechanismus nicht mehr wirksam ist. Bei allen Transplantaten wurde jedoch mit der IF auch in diesem Versuch eine diffuse IgG-Ablagerung aufgezeigt. Die Ausprägung der TIN hat sich auch hier als unabhängig vom anti-TBM-Ak erwiesen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die immunologisch induzierte TIN bei der Ratte nur im Zusammenhang mit anti-TBM-Ak auftritt. Da die Ak auch ohne interstitielle Entzündung an der TBM gefunden werden, müssen noch andere, wahrscheinlich zelluläre Reaktionen in Gang gesetzt werden, damit eine TIN entsteht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die TIN der BN-Ratte ist ein experimentelles Modell einer durch Immunisierung mit TBM hervorgerufenen interstitiellen Entzündung mit Tubulusschädigung und linearer Ablagerung von anti-TBM-Ak an der TBM. Sie verläuft akut und heilt unter Narbenbildung ab. Ihre Ausprägung ist abhängig von der zur Immunisierung verwendeten TBM-Dosis und Adjuvans-Dosis. Während eine hohe Adjuvans-Dosis (10 mg M.tuberculosis pro Tier) auch eine stärkere TIN hervorruft, liegt die maximal wirksame Dosis STBM bei 0.4 mg pro Tier. Der Titer der anti-TBM-Ak im Blut ist von der Stärke der TIN unabhängig und variiert nicht. Lewis-Ratten werden auch bei der Immunisierung mit den bei BN-Ratten wirksamsten STBM- und Adjuvans-Dosen nicht von einer TIN befallen. Die in der Literatur beschriebene Immunisierung mit autologer TBM ruft bei ihnen keine TIN hervor. Wiederholte Immunisierung von BN-Ratten mit geringen Dosen STBM in gleichbleibender oder steigender Dosierung führt nicht zur Ausbildung einer TIN, sondern induziert offenbar einen Mechanismus, der die Brechung der Toleranz für TBM aktiv behindert bzw. den eigentlichen pathogenetischen Weg betrifft. Der anti-TBM-Ak-Titer steigt jedoch wie gewöhnlich an, so daß dieser blockierende Effekt möglicherweise nur einen zellulären Mechanismus betrifft. Eine chronische TIN kann deshalb nicht induziert werden. Transplantation einer normalen syngenischen Niere in ein immunisiertes Tier führt zu einer wesentlich weniger ausgeprägten, makroskopisch meist nicht sichtbaren TIN im Transplantat. Da TBM-Ak ebenso wie in der eigenen, stark befallenen Niere abgelagert werden, muß man annehmen, daß der Pathomechanismus sehr komplex ist, und durch die praktizierte zeitliche Staffelung der Transplantation nicht zu erfassen war. Die Übertragung von anti-TBM-Ak auf gesunde Tiere führt nicht zu einer makroskopisch feststellbaren TIN.

Diese Ergebnisse bieten keinen Anhaltspunkt dafür, daß anti-TBM-Ak ohne weitere, immunologisch steuernde Prozesse allein für die Entstehung der TIN verantwortlich sind.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Baldamus, C.A., Kachel, G., Koch, C., Schoeppe, W.: Cellular Immune Mechanisms in Experimental Tubulo-Interstitial Nephritis (TIN)
Contr.Nephrol. 16:141, 1979

- (2) Baldamus, C.A.: Immunologically Induced Tubulo-Interstitial Nephritis: Experimental Models in Rats
Contr.Nephrol. 19:104, 1980

- (3) Bash, J.A., Waksman, B.H.: The Suppressive Effect of Immunisation on the Proliferative Responses of Rat T Cells in Vitro
J.Immunol. 114:782, 1975

- (4) Bomford, R.: The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. I. Effect on the antibody response to bovine serum albumin and sheep red blood cells of Freund's incomplete and complete adjuvants, alhydrogel, corynebacterium parvum, bordetella pertussis, muramyl dipeptide and saponin
Clin.exp.Ummunol. 39:426, 1980

- (5) Brown, C.A., Carey, K., Colvin, R.B.: Inhibition of Autoimmune Tubulointerstitial Nephritis in Guinea Pigs by Heterologous Antisera Containing Anti-Idiotypic Antibodies
J.Immunol. 123:2102, 1979

- (6) Gershon, R.K., Gery, I., Waksman, B.H.: Suppressive Effects of in Vivo Immunisation on PHA Responses in Vitro
J.Immunol. 112:215, 1974

- (7) Hall, C.L., Colvin, C.B., Carey, K., McCluskey, R.T.:
Passive Transfer of Autoimmune Disease with
Isologous IgG₁ and IgG₂ Antibodies to the Tubular
Basement Membrane in Strain XIII Guinea Pigs
J.exp.Med. 146:1246, 1977

- (8) Hudson, L., Hay, F.C.: Practical Immunology, P.22
Blackwell Scientific Publications, Oxford 1976

- (9) Krieger, A.: Experimentelle, Autoimmune Tubulo-
Interstitielle Nephritis
Inaugural-Dissertation München 1979

- (10) Lee, S.: An improved technique of renal transplantation
in the rat
Surgery 61:771, 1967

- (11) Langer, K.H., Thoenes, W.: Characterisation of Cells
Involved in the Formation of Granuloma
An Ultrastructural Study on Macrophages, Epitheloid
Cells, and Giant Cells in Experimental Tubulo-
Interstitial Nephritis
Virchows Arch (Cell Pathol) 36:177, 1981

- (12) Lehman, D.H., Marquardt, H., Wilson, C.B., Dixon, F.J.:
Specificity of Autoantibodies to Tubular and
Glomerular Basement Membranes Induced in Guinea
Pigs
J.Immunol. 112:241, 1974

- (13) Lehmann, D.H., Wilson, C.B., Dixon, F.J.: Interstitial
nephritis in rats immunized with heterologous
tubular basement membrane
Kidney Int. 5:187, 1974

- (14) Lehman, D.H., Lee, S., Wilson, C.B., Dixon, F.J.:
Induction of Antitubular Basement Membrane
Antibodies in Rats by Renal Transplantation
Transplantation (Baltimore) 17:429, 1974
- (15) Lehman, D.H., Wilson, C.B.: Role of Sensitized Cells
in Antitubular Basement Membrane Interstitial
Nephritis
Int. Archs Allergy appl Immun. 51:168, 1976
- (16) Mahieu, P., Winand, R.J.: Chemical Structure of Tubular
and Glomerular Basement Membranes of Human Kidney.
Isolation, Purification, Carbohydrate and Amino
Acid Comp.
Eur.J.Biochem. 12:410, 1970
- (17) Neilson, E.G., Phillips, S.M.: Cell-Mediated Immunity
in Interstitial Nephritis. I. T Lymphocyte
systems in Nephritic Guinea Pigs: The Natural
History and Diversity of the Immune Response
J.Immunol. 123:2373, 1979
- (18) Neilson, E.G., Phillips, S.M., Cell-Mediated Immunity
in Interstitial Nephritis. II. T Lymphocyte
Effector Mechanisms in Nephritic Guinea Pigs:
Analysis of the Renotropic Migration and
Cytotoxic Response
J.Immunol. 123:2381, 1979
- (19) Neilson, E.G., Jimenez, S.A., Phillips, S.M.: Cell-
Mediated Immunity in Interstitial Nephritis.
III. T Lymphocyte-Mediated Fibroblast Proliferation
and Collagen Synthesis: An Immune Mechanism for
Renal Fibrogenesis
J.Immunol. 125:1708, 1980

- (20) Neilson, E.G., Phillips, S.M.: Cell-Mediated Immunity
in Interstitial Nephritis. IV. Anti-Tubular
Basement Membrane Antibodies Can Function in
Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Reactions:
Observations on a Nephritogenic Effector Mechanism
Acting as an Informational Bridge Between the
Humoral and Cellular Immune Response
J.Immunol. 126:1990, 1981

- (21) Novotny, A.: Basic Exercises in Immunochemistry, p 215,
P 273f
2nd ed. Springer-Verlag 1979

- (22) Pennline, K.J., Smith, J.P., Better-Suermann, H.: My
Kingdom for an Inbred Rat
Transplantation 34:70, 1982

- (23) Robertson, J.L., Hill, G.S., Rowlands, D.T.:
Tubulointerstitial Nephritis and Glomerulo-
nephritis in Brown-Norway Rats Immunized With
Heterologous Glomerular Basement Membrane
Am.J.Pathol. 88:53, 1977

- (24) Rudofsky, U.H., McMaster, P.R., Ma Wai-Sai, Steblay,
R.W., Pollara, B.: Experimental Autoimmune Renal
Cortical Tubulointerstitial Disease in Guinea
Pigs Lacking the Fourth Component of Complement (64)
J.Immunol. 112:1387, 1974

- (25) Rudofsky, U.H., Steblay, R.W., Pollara, B.: Inhibition
of Experimental Autoimmune Renal Tubulointerstitial
Disease in Guinea Pigs by Depletion of Complement
with Cobra Venom Factor
Clin.Immunol.Immunopathol. 3:396, 1975

- (26) Rudofsky, U.H., Pollara, B.: Studies on the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Renal Tubulointerstitial Disease in Guinea Pigs. I. Inhibition of Tissue Injury in Leucocyte-Depleted Passive Transfer Recipients
Clin.Immunol.Immunopathol. 4:425, 1975
- (27) Rudofsky, U.H., Pollara, B.: Studies on the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Renal Tubulointerstitial Disease in Guinea Pigs. II. Passive Transfer of Renal Lesions by Antitubular Basement Membrane Autoantibody and Nonimmune Bone Marrow Cells to Leucocyte-Depleted Recipients
Clin.Immunol.Immunopathol. 6:107, 1976
- (28) Rudofsky, U.H., Esposito, L.L., Dilwith, R.L., Pollara, B.: Studies on the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Renal Tubulointerstitial Disease in Guinea Pigs. V. Deposition of C3PA on the Tubular Basement Membranes
Clin.Immunol.Immunopathol. 8:467, 1977
- (29) Rudofsky, U.H., Pollara, B.: Studies on the pathogenesis of experimental autoimmune tubulointerstitial disease in guinea-pigs. IV. Failure to inhibit mononuclear cell accumulation with Niridazole
Clin.exp.Immunol. 27:522, 1977
- (30) Rudofsky, U.H., McMaster, P.R.B., Pollara, B.: Studies on the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Renal Tubulointerstitial Disease in Guinea Pigs. VI. Induction of Renal Lesions by Active or Passive Immunisation of Strain 2 Guinea Pigs.
Int.Archs.Allergy appl.Immun. 60:398, 1979

- (31) Rudofsky, U.H., Dilwith, R.L., Tung, K.S.K.: Susceptibility Differences of Inbred Mice to Induction of Autoimmune Renal Tubulointerstitial Lesions
Lab.Invest. 43:463, 1980

- (32) Rudofsky, U.H., Dilwith, R.L., Lynes, M., Flaherty, L.: Murine Monoclonal Antikidney Autoantibodies. I. Anti-Renal Proximal Tubular Basement Membrane Autoantibodies
(unpublished)

- (33) Spiro, G.R.: Studies on the Renal Glomerular Basement Membrane Preparation and Chemical Composition
J.Biol.Chem. 242:1915, 1966

- (34) Steblay, R.W., Rudofsky, U.: Renal Tubular Disease and Autoantibodies against Tubular Basement Membrane Induced in Guinea Pigs
J.Immunol. 107:589, 1971

- (35) Steblay, R.W., Rudofsky, U.: Transfer of Experimental Autoimmune Renal Cortical Tubular and Interstitial Disease in Guinea Pigs bei Serum
Science 180:966, 1973

- (36) Sugisaki, T., Klassen, J., Milgrom, F., Andres, G.A., McCluskey, R.T.: Immunopathologic Study of an Autoimmune Tubular and Interstitial Renal Disease in Brown Norway Rats
Lab.Invest. 28:658, 1973

- (37) Sugisaki, T., Yoshida, T., McCluskey, R.T., Andres, G.A., Klassen, J.: Autoimmune Cell-Mediated Tubulointerstitial Nephritis Induced in Lewis Rats by Renal Antigens
Clin.Immunol.Immunopathol. 15:33, 1980

- (38) Sugisaki, T., Kano, K., Andres, G., Milgrom, F.:
Antibodies to tubular basement membrane
elicited by stimulation with allogeneic kidney
Kidney Int. 21:557, 1982
- (39) Thoenes, G.H., Krieger, A., Pielsticker, K.:
Evidence for Organ-Specific Alloantigens
Transpl.Proc. 11:1604, 1979
- (40) Van Zwieten, M.J., Bhan, A.K., McCluskey, R.T., Collins,
A.B.: Studies on the Pathogenesis of Experimental-
Anti-Tubular Basement Membrane Nephritis in the
Guinea Pig
AmJ.Pathol. 83:531, 1976
- (41) Van Zwieten, M.J., Leber, P.D., Bhan, A.K., McCluskey,
R.T.: Experimental Cell-Mediated Interstitial
Nephritis Induced with Exogenous Antigens
J.Immunol. 118:589, 1977
- (42) Waksman, B.H.: Tolerance, the thymus, and suppressor
T cells
Clin.exp.Immunol. 28:363, 1977
- (43) Williams, C.A., Chase, M.W.: Methods in Immunology
and Immunochemistry V, p 266f
Academic Press, New York 1968

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. H. Thoenes möchte ich für die Überlassung dieser Promotionsarbeit, seine Hilfe und Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. K. H. Langer vom Pathologischen Institut der Universität Mainz (Vorstand: Prof. Dr. W. Thoenes) gilt mein besonderer Dank für die Anfertigung und Beurteilung eines großen Teils der histologischen Präparate.

Frl. A. Vaupel danke ich für die Anfertigung der histologischen Präparate im Labor. Auch Gela Urban und Inge Doering möchte ich für die mir gewährte Unterstützung danken.

Lebenslauf

- 1956 geboren am 10.01.1956 in Karlsruhe als Sohn von Nikolaus Delius, Professor für Flöte an der Hochschule für Musik, und Dr. Ingeborg Delius, geb. Gerke.
- 1962 Besuch der Europaschule in Karlsruhe
- 1965 Umzug nach Freiburg, dort Beendigung der Volksschulzeit und
- 1966 im April Wechsel auf das altsprachliche Berthold-Gymnasium
- 1974 im Mai dort Abitur, Beginn des Medizinstudiums im Oktober an der Universität Freiburg
- 1976 im Sommer Physikum
- 1977 im Sommer 1. Teil des Staatsexamens, danach Wechsel nach München an die Ludwig Maximilians-Universität
- 1978 im Herbst für ein Jahr Studium am Hammersmith Hospital in London
- 1980 im Frühjahr 2. Teil des Staatsexamens, danach für ein Jahr als Doktorand im Labor von Prof. Thoenes
- 1981 ab April Praktisches Jahr mit Wahlfach Neurologie
- 1982 im April Ärztliche Prüfung und im Mai Approbation

